



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Konstruktion einer Flagellum-Deletionsmutante in *Natrialba magadii*
und Charakterisierung bestehender *Natrialba magadii* Mutanten“

Verfasserin

Beatrix Alte

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Chemie UniStG

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	11
1.1 <i>Archaea</i> – die dritte Domäne	11
1.1.1 Systematik innerhalb der <i>Archaea</i>	13
1.1.2 Anpassungen haloalkaliphiler <i>Archaea</i>	14
1.1.2.1 Anpassung an hohe Salinität	15
1.1.2.2 Anpassung an alkaline Umgebung	16
1.2 <i>Natrialba magadii</i>	17
1.2.1 <i>Natrialba</i> extrazelluläre Protease (NEP)	18
1.2.2 Flagellum	19
1.2.3 Transformation von <i>Nab. magadii</i>	21
1.3 ϕ Ch1 – ein Halophage	21
1.3.1 Archaeale Viren – ein kurzer Überblick	21
1.3.2 Generelle Informationen über ϕ Ch1	22
1.3.3 Organisation des Genoms	24
1.3.4 Ausgewählte ORFs	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1. Verwendete Stämme	28
2.1.2 Antibiotika und Zusätze	28
2.1.3 Primer	29
2.1.4 Plasmide	29
2.1.5 Medien	31
2.1.5.1 LB-Medium	31
2.1.5.2 Vollmedium für haloalkaliphile <i>Archaea</i> : <i>Natrialba</i> Vollmedium NVM ⁺	31

Inhaltsverzeichnis

2.1.5.3 Definierte Medien für haloalkaliphile <i>Archaea</i>	32
2.1.5.3.1 Natrialba Mineralmedium NMM ⁺	32
2.1.5.3.2 Natrialba Mineralmedium NMMA ⁺	32
2.1.5.3.3 Natrialba Mineralmedium NMMb ⁺	33
2.1.5.3.4 1000x Spurenelemente	33
2.1.6 Puffer und Lösungen	34
2.1.6.1 Herstellen kompetenter Zellen	34
2.1.6.1.1 <i>E. coli</i>	34
2.1.6.1.2 <i>Nab. magadii</i>	34
2.1.6.2 Proteinmethoden	35
2.1.6.2.1 SDS-PAGE und Western Blot	35
2.1.6.2.2 Denaturierende Proteinaufreinigung	36
2.1.6.3 DNA	36
2.1.6.3.1 Gelelektrophorese	36
2.1.6.3.2 Southern Blot	37
2.1.6.4 Lösungen und Puffer für haloalkaliphile <i>Archaea</i>	37
2.1.6.4.1 Isolierung von ϕ Ch1	37
2.1.6.4.2 Chromosomale DNA aus <i>Nab. magadii</i>	38
2.1.6.4.3 BgaH-Aktivitätsmessung	38
2.1.7 Antikörper	38
2.1.8 DNA- und Proteinmarker	39
2.1.8.1 DNA-Marker	39
2.1.8.2 Proteinmarker	40
2.1.9. Enzyme und entsprechende Puffer	40

Inhaltsverzeichnis

2.1.9.1 Restriktionsenzyme	40
2.1.9.2 Enzyme für PCR	40
2.1.9.3 Weitere Enzyme	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Probenahme und -vorbereitung	41
2.2.1.1 Probe BgaH-Aktivitätsmessung	41
2.2.1.2 Proteinprobe Zellrohextrakte	41
2.2.1.3 Proteinprobe TCA-Fällung	41
2.2.1.4 Proteinprobe aufgereinigtes Protein	42
2.2.1.5 Probenvorbereitung Phagentiter	42
2.2.2 Methoden <i>Archaea</i>	42
2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen - <i>Nab. magadii</i>	42
2.2.2.2 Transformation	42
2.2.2.3 Transformation mit Minimalmedium	43
2.2.2.4 Kontrolle der Transformanden	44
2.2.2.5 Herstellen eines Templates aus <i>Nab. magadii</i>	44
2.2.2.6 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Nab. magadii</i>	44
2.2.2.7 BgaH-Aktivitätsmessung	45
2.2.2.8 Proteingehalt einer Proteinprobe aus <i>Nab. magadii</i>	46
2.2.3 Methoden für Phagen	46
2.2.3.1 Phagenisolation aus <i>Nab. magadii</i> L11 und <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	46
2.2.3.2 Phagentiter	47
2.2.4 Methoden <i>E. coli</i>	47
2.2.4.1 Herstellen hitzeschock-kompetenter Zellen	47

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.2 Transformation durch Hitzeschock	48
2.2.4.3 Kontrolle und Bestätigung der Transformanden	48
2.2.5 Methoden Proteine	49
2.2.5.1 Expression und denaturierende Aufreinigung eines Proteins mit His-Tag	49
2.2.5.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	50
2.2.5.3 Western Blot	50
2.2.5.3.1 Blotten	51
2.2.5.3.2 Detektion mittels Antikörper	51
2.2.6 DNA-Methoden	52
2.2.6.1 Agarosegelelektrophorese	52
2.2.6.2 PAA-Gelelektrophorese	52
2.2.6.3 Darstellung der DNA	52
2.2.6.4 Gelelution aus Agarosegel	53
2.2.6.5 Gelelution aus PAA-Gel	53
2.2.6.6 PCR	54
2.2.6.6.1 Template-DNA	54
2.2.6.6.2 Primer	54
2.2.6.6.3 PCR-Ansatz und Programm	54
2.2.6.7 PCR-Aufreinigung	55
2.2.6.8 Plasmidisolation aus E. coli	55
2.2.6.9 Restriktion	55
2.2.6.10 Klenow-Fragment	56
2.2.6.11 Ligation	56
2.2.6.12 Southern Blot	56

Inhaltsverzeichnis

2.2.7 Klonierungsstrategien	58
2.2.7.1 pRo5-prom tna	58
2.2.7.2 pRo5-tna-bgaH	59
2.2.7.3 pRo5-tnaN-bgaH	59
2.2.7.4 pRo5-tnaN-ORF93	59
2.2.7.5 pNB102 -prom49-ORF79	60
3 Ergebnisse und Diskussion	61
3.1 Deletionsmutanten von <i>Nab. magadii</i> L13 und ϕ Ch1	61
3.1.1 Deletionsmutanten von <i>Nab. magadii</i> L13	61
3.1.2 Deletionsmutanten von ϕ Ch1	63
3.2 Flagellum-Deletionsmutante von <i>Nab. magadii</i> L13	63
3.2.1 Ausgangssituation	63
3.2.2 Transformation und Kontrolle der Transformanden	65
3.2.3 Homozygote Mutante	65
3.2.4 Diskussion	67
3.3 Deletion ORF11 von ϕ Ch1	68
3.3.1 Ausgangssituation	68
3.3.2 Ergebnisse	69
3.3.3 Diskussion	71
3.4 <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	72
3.4.1 Ausgangssituation	72
3.4.2 Vergleich Expressionsmuster <i>Nab. magadii</i> L11 und <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	72
3.4.3 Komplementierung von <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	76
3.4.4 Diskussion	77

Inhaltsverzeichnis

3.5 <i>Nab. magadii</i> P3 – Komplementation	79
3.5.1 Ausgangssituation	79
3.5.2 Herstellung eines Antiserums gegen NEP	80
3.5.3 Vergleich der NEP-Expression in mehreren Stämmen	82
3.5.4 Diskussion	84
3.6 ORF93	85
3.6.1 Ausgangssituation	85
3.6.2 Quantifizierung der Promotoraktivität	86
3.6.3 Analyse der Funktion der ORF93	91
3.6.4 Diskussion	94
4 Referenzen	96
5 Anhang	103
5.1 Abbildungsverzeichnis	103
5.2 Tabellenverzeichnis	104
5.3 Zusammenfassung	105
5.4 Abstract	107
5.5 Danksagung	109
5.6 Curriculum Vitae	111

1 Einleitung

1.1 *Archaea* – die dritte Domäne

Carl R. Woese schlug in seinen Arbeiten (1977, 1990) vor, die bis zu diesem Zeitpunkt üblichen Taxonomiesysteme zu überdenken. Die Teilung der Welt in die fünf gleichwertigen Königreiche *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* und *Monera* spiegelte seiner Meinung nach die tatsächlichen Verhältnisse ebenso verzerrt wieder wie die Zweiteilung in Pro- und Eukaryoten, zumal bei Letzterer die Zuordnung nach dem Ausschlussprinzip und damit ungenau erfolgte: Entsprach eine Spezies nicht den Kriterien für Eukaryoten, musste sie folglich ein Prokaryot sein (Woese *et al.*, 1990). Bei Ersterer hingegen war es die Gleichwertigkeit der Königreiche, welche dieses altbewährte System nicht den wissenschaftlichen Gegebenheiten entsprechen ließ. „[...] *in giving the kingdom Monera the same taxonomic rank as the Animalia, Plantae, Fungi, and Protista, the five-kingdom formulation ignores the fact that the differences between Monera (prokaryotes) and the four other kingdoms are far more significant, and of a qualitatively different nature, than the differences among these four.*“ (Woese *et al.*, 1990)

Um diesen Unterschieden wie auch Erkenntnissen aus Analysen auf molekularer Ebene Rechnung zu tragen, gleichzeitig aber die weitgehende Beibehaltung der bisher gültigen Taxonomie zu ermöglichen, regte Woese im Jahr 1990 die Einführung eines neuen Ranges oberhalb der Königreiche an. Diese Neuordnung wurde durch die aufkommenden vergleichenden Analysen der 16S/18S rRNA unterstützt und bedeutete neben einem tiefgreifenden Umbruch des Systems zugleich die Loslösung der *Archaeobacteria* (kurz: *Archaea*) aus der Domäne der Prokaryoten. Weiters wurde die neue Domäne in die Königreiche *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota* geteilt (Woese *et al.*, 1990).

Vergleicht man die Eigenschaften der *Archaea* mit jenen der beiden anderen Domänen, so ergeben sich mit beiden Gemeinsamkeiten. Am offensichtlichsten ist hierbei die ähnliche Physiologie der *Archaea* und der *Bacteria*, welche auch zur ursprünglichen Fehlklassifizierung der Ersteren führte: Es handelt sich in beiden Fällen um einzellige Organismen vergleichbarer Größe ohne Nucleus oder Zellorganellen (Brown und Doolittle, 1997).

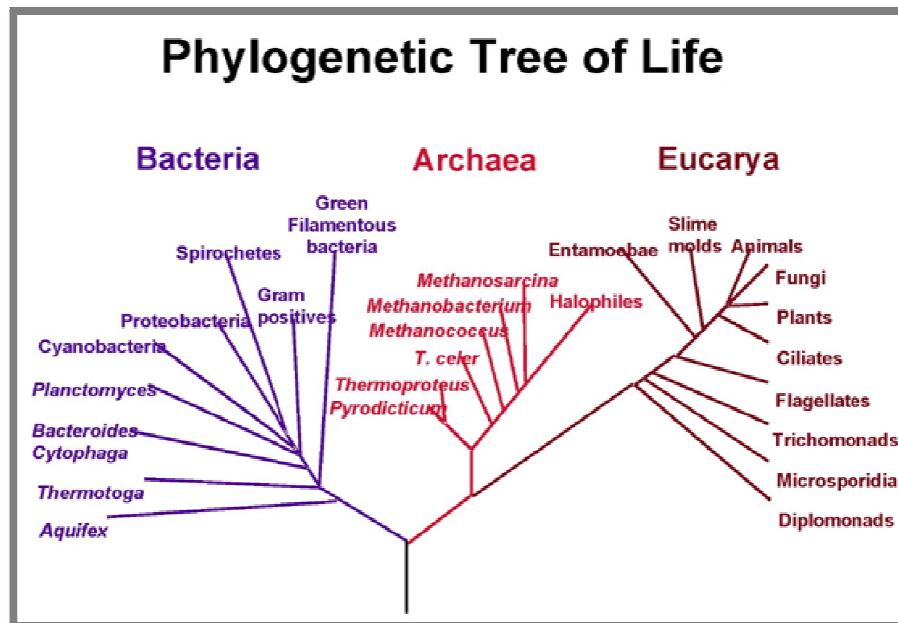


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum

Gezeigt werden die drei Domänen des Lebens nach Carl R. Woese (1990), basierend auf vergleichenden Analysen der 16S/18S rRNA.

Grafik und Text aus NASA, 2003

Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Domänen sind vielfältig. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit sollen nun die am wichtigsten erscheinenden Beispiele kurz dargestellt werden. Im Gegensatz zu *Bacteria* findet sich in der Zellmembran von *Archaea* kein Peptidoglycan, wohl aber bei einigen Spezies Pseudopeptidoglycan. Zusätzlich zur Zellmembran besitzen die meisten *Archaea* eine S-Schicht. Bei dieser Schicht handelt es sich um eine kristalline Anordnung von proteinösen Einheiten (Sleytr, 1978). Außerdem sind in Bakterien die Glycerolipide mit 1,2-sn-Glycerol verestert, während es sich in *Archaea* um Etherbindungen mit 2,3-sn-Glycerol handelt (Forterre *et al.*, 2002; Brown und Doolittle, 1997). Die Organisation des Genoms erfolgt bei *Archaea* ähnlich jener von *Bacteria*, nämlich durch Zusammenfassen mehrerer ORFs zu transkriptionalen Einheiten unter Kontrolle eines gemeinsamen Promotors (Brown und Doolittle, 1997). Die Replikation wie auch die Kompaktierung der DNA in *Archaea* erinnert wiederum mehr an die Systeme der *Eukarya*, auch wenn sich die Histone der *Euryarcheota* von jenen der *Eukarya* in Aufbau und Größe unterscheiden (Barry und Bell, 2006).

Einleitung

Die metabolischen Pfade der *Archaea* entsprechen eher jenen der *Bacteria* denn jenen der *Eukarya* (Keeling *et al.*, 1994; Reeve *et al.*, 1997).

Nach derzeitigem Wissensstand sind Mitglieder der *Archaea* Rekordhalter, was Wachstum in verschiedenen Extremen (höchste Temperatur, niedrigster pH-Wert, höchste NaCl-Konzentration) anbelangt (Chaban *et al.*, 2006), und nicht zuletzt aus diesem Grund für die Wissenschaft von großem Interesse. Trotz dieser beeindruckenden Eigenschaften einiger Spezies wäre jedoch die Annahme, alle *Archaea* lebten unter extremen Bedingungen, schlichtweg falsch. Tatsächlich sind *Archaea* weit verbreitet (Olsen, 1994). Dies wird durch die Arbeit von Karner *et al.* (2001) unterstützt, welche ergab, dass alleine das Königreich *Crenarcheota* bis zu 20 % des gesamten Picoplanktons in den Meeren ausmacht.

Weiters ist zu bemerken, dass jene *Archaea*, welche unter extremen Bedingungen leben, ihren Lebensraum mit Mitgliedern mindestens einer anderen Domäne teilen. So finden sich auch bei *Bacteria* und *Eukarya* psychrophile, acidophile, alkaliphile, piezophile, xerophile und halophile Organismen. Das einzige Extrem, welches *Bacteria* und *Archaea* vorbehalten bleibt, ist „hyperthermophil“ (Rothschild und Mancinelli, 2001).

1.1.1 Systematik innerhalb der *Archaea*

Wie bereits erwähnt, wurden der Domäne *Archaea* zum Zeitpunkt ihrer „Entdeckung“ zwei Königreiche zugeschrieben, nämlich *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota*. Diese Einteilung hielt dem Test der Zeit bislang stand, es kamen lediglich die Königreiche *Nanoarcheota* (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003) und *Korarcheota* (Barns *et al.*, 1996) hinzu. Diese vier Königreiche weisen Unterschiede bezüglich der Zahl der beinhalteten Ordnungen auf: Zu den *Crenarchaeota* werden die Ordnungen *Sulfolobales*, *Thermoproteales* und *Desulfurococcales* gezählt, zu den *Euryarchaeota* die Ordnungen *Methanopyrales*, *Thermococcales*, *Archaeoglobus*, *Methanococcales*, *Thermoplasmatales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* und *Halobacteriales* (Forterre *et al.*, 2002). *Nanoarchaeota* umfasst nur eine Spezies *Nanoarchaeum equitans* (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003). Die Dimension des Königreichs *Korarcheota* kann derzeit nicht abgeschätzt werden, da die hierzu gehörenden

Einleitung

Spezies bislang nicht kultivierbar sind und sich somit einer genaueren Analyse entziehen. Ihre Existenz wurde durch Untersuchung von Proben wie zum Beispiel Meerwasser hinsichtlich enthaltener DNA nachgewiesen (Forterre *et al.*, 2002; Barns *et al.*, 1996). Es kann festgestellt werden, dass das Königreich *Euryarcheota* eine größere Vielfalt an Phänotypen wie etwa Halophile, Methanogene und Thermoacidophile beherbergt, während sich dieses Spektrum bei den *Crenarcheota* auf Hyperthermophile beschränkt (Forterre *et al.*, 2002).

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Familie der *Halobacteriaceae* (Ordnung *Halobacteriales*, Klasse *Halobacteria*, Königreich *Euryarchaeota*). Mit Stand 2008 umfasst diese 26 Genera mit insgesamt 85 klassifizierten Spezies. Genus 20 trägt den Namen *Natrialba* (Abkürzung: *Nab.*), hierzu zählen die sechs Spezies *Nab. asiatica*, *Nab. magadii*, *Nab. taiwanensis*, *Nab. aegyptiaca*, *Nab. hulunbeirensis* und *Nab. chahannaoensis* (ICSP, 2011). Ebenso wie die Genera *Natronobacterium*, *Natrinema*, *Natronomonas* *Natronorubrum* und *Natronococcus* zählt *Natrialba* zu den haloalkaliphilen *Archaea*.

1.1.2 Anpassungen haloalkaliphiler *Archaea*

Eine ergiebige Quelle für die Entdeckung haloalkaliphiler *Archaea* sind hypersaline Sodaseen, in denen sich hohe Carbonat- und Chloridkonzentrationen finden. Die Entstehung derartiger Gewässer hängt von einigen Voraussetzungen ab. So ist etwa eine hohe Verdunstungsrate notwendig, um das bei Regenfällen aus dem Umland eingeschwemmte Carbonat und Chlorid in den Seen entsprechend aufzukonzentrieren. Der andere kritische Faktor ist die Gegenwart bzw. das Fehlen von Magnesium- und Kalziumionen (Jones *et al.*, 1998). Die Umgebung von Sodaseen zeichnet sich durch einen starken Mangel an beiden genannten Kationen aus. Wäre dem anders, käme es zum Ausfallen des Carbonats und damit zur verstärkten Bildung von Sedimenten. Gleichzeitig würde mit der sinkenden Carbonatkonzentration in den Seen deren hoher pH-Wert in Ermangelung der Pufferwirkung des Carbonats instabil. Bei den bekannten Sodaseen liegt der pH-Wert bei 8 bis über 12 (Jones *et al.*, 1998).

Einleitung

1.1.2.1 Anpassung an hohe Salinität

Als halophil wird ein Organismus bezeichnet, wenn er mindestens 2,5 M NaCl im Medium für optimales Wachstum benötigt (Kushner *et al.*, 1988). Um unter der genannten Bedingung leben zu können, bedarf es einiger Anpassungen im Vergleich zu Spezies, die unter – aus menschlicher Sicht – weniger extremen Bedingungen leben. Durch die hohe Salzkonzentration im umgebenden Medium und den daraus resultierenden osmotischen Druck wird der Wasserhaushalt massiv beeinflusst. Für alle halophilen Organismen gilt daher, „[...] *that their cytoplasm has to be at least isoosmotic with their surrounding medium*“ (Oren, 2008). Eine aktive Form des Wasserhaushalts, etwa durch Transportsysteme, wäre aufgrund des hohen Energieverbrauchs nicht sinnvoll (Brown, 1990). Es bleiben zwei konträre Ansätze, um dem Problem des osmotischen Drucks beizukommen: „high-salt-in“- und „low-salt-in“-Strategie (Oren, 2008).

Die weiter verbreitete der beiden Strategien erfordert kaum Anpassungen des Proteoms. „*The ,low-salt, organic-solutes-in‘ strategy is based on the biosynthesis and/or accumulation of organic solutes that do not interfere greatly with the activity of normal enzymes.*“ (Ma *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass die intrazellulären Salzkonzentrationen von Organismen mit dieser Strategie weitgehend mesophilen Bedingungen entsprechen, wodurch ebensolche Enzyme nahezu ungehindert arbeiten können. Um dies zu gewährleisten, ergibt sich jedoch ein erhöhter Energieverbrauch, da die organischen Osmolyte entweder synthetisiert oder akkumuliert werden müssen. Ein Hinweis auf Vorliegen dieser Strategie ist die Anpassungsfähigkeit solcher Organismen an eine breite Palette von Salzkonzentrationen (Oren, 2002).

Im Gegenzug dazu beruht die „high-salt-in“-Strategie auf der Anreicherung von KCl im Cytoplasma. Dabei werden „*molare concentrations of potassium and chloride*“ erreicht (Lanyi, 1974). Energetisch erscheint diese Strategie recht günstig, jedoch setzt sie voraus, dass das gesamte Proteom des betreffenden Organismus an ebendiese Salzkonzentrationen angepasst ist. Diesbezügliche Probleme beginnen bei der Erhaltung der Enzymkonformation und damit einhergehend der Enzymaktivität (Oren, 2008) und enden bei der verminderten Löslichkeit von Proteinen. Ein populäres Beispiel für die Verwendung der „high-salt-in“-Strategie ist

Einleitung

Halobacterium salinarum, ein extrem-halophiles Archaeon aus der Familie der *Halobacteriaceae*.

Bei Verwendung der „high-salt-in“-Strategie sind Anpassungen der Proteine an den hohen Salzgehalt der Zelle notwendig, um sowohl die Stabilität der Konformation als auch die Löslichkeit zu erhalten. Dies wird durch einen – verglichen mit nicht-halophilen Homologen – höheren Anteil an sauren Aminosäuren bewerkstelligt. Außerdem konnten Glycin, Alanin und Valin häufiger, Lysine und aliphatische Reste seltener in halophilen Proteinen detektiert werden (Lanyi, 1974; Madern *et al.*, 1995). Ein weiterer Unterschied zu nicht-halophilen Proteinen besteht in den vergleichsweise starken Interaktionen der nativen Proteine mit dem jeweiligen Lösungsmittel und den darin gelösten Ionen. Für nicht-halophile Proteine kann Ähnliches nur im ungefalteten Zustand unter Verwendung von „salting-in“-Bedingungen beobachtet werden. (Pundak und Eisenberg, 1981; Calmettes *et al.*, 1987; Bonneté *et al.*, 1994).

1.1.2.2 Anpassung an alkaline Umgebung

Der Terminus „alkaliphil“ wird verwendet, wenn ein pH-Wert von 9 oder darüber für das Wachstum benötigt wird. Nähert man sich diesem Problem gedanklich, erscheint es zunächst logisch anzunehmen, dass der pH-Wert im Inneren der Zellen eines alkaliphilen Organismus jenem der Umgebung entspräche und daher umfassende Anpassungen an ebendiesen notwendig seien. Auf den zweiten Blick gibt es für Organismen in alkalinen Medien Möglichkeiten, den internen pH-Wert deutlich niedriger zu halten (vergleiche „low-salt-in“-Strategie für hohe Salinität). Dass dies tatsächlich der Fall ist, zeigen Untersuchungen von Horikoshi *et al.* aus dem Jahr 1999.

Im Gegensatz zu intrazellulären Proteinen sind die Zellmembranen in jedem Fall den Bedingungen des Mediums ausgesetzt und benötigen daher besondere Eigenschaften. Um den bereits erwähnten pH-Unterschied zwischen Medium und Cytoplasma aufrechterhalten zu können, muss die Membran für Na^+ - und H^+ -Ionen undurchlässig sein (van de Vossenberg *et al.*, 1999). Eine weitere Besonderheit ist der Einbau von sauren Polymeren, welche durch elektrostatische Interaktionen mit Kationen (vorwiegend Na^+ und H_3O^+) eine positiv geladene Hülle um die Zelle bilden. Durch diese Schicht ist es vorstellbar, dass an der Oberfläche ein

Einleitung

etwas niedrigerer pH-Wert als im umgebenden Medium vorherrscht. Dies ergibt sich aus der lokal geringeren Konzentration der OH^- -Ionen (Horikoshi *et al.*, 1999). Zusätzlich zu dieser Adaption besteht für aerobe alkaliphile Organismen die Möglichkeit, Na^+/H^+ -Antiporter zu verwenden und die Protonen zu metabolisieren. Die Verwendung derartiger Antiporter hat eine Reihe von Vorteilen:

- Die Natriumkonzentration innerhalb der Zelle wird gering gehalten, was im Speziellen in Habitaten mit hohem Salzgehalt von Vorteil ist.
- Gleichzeitig tragen die raren H^+ -Ionen zur Stabilität des intrazellulären pH-Werts im mesophilen Bereich bei.
- Durch den Einsatz der Antiporter wird der transmembrane pH-Gradient verstärkt, was wiederum zum Aufbau einer Proton-Motive-Force (PMF) beiträgt (van de Vossenberg *et al.*, 1999). Diese Form gespeicherter Energie kann in weiterer Folge genutzt werden.

1.2 *Natrialba magadii*

Ursprünglich als *Natronobacterium magadii* benannt, wurde dieses haloalkaliphile Archaeon im Jahr 1984 aus Proben des hypersalinen Sodasees Magadi in Keny

ia isoliert (Tindall *et al.*, 1984). Der Transfer zu *Natrialba* erfolgte 1997 nach dem Vorschlag von Kamekura *et al.*, nach Analyse der 16 rRNA. Morphologisch handelt es sich um Stäbchen von etwa 0,5 bis 0,7 μm Länge. Sie besitzen ein Flagellum, auf welches im Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen wird.

Was die Wachstumsbedingungen anbelangt, so ist *Nab. magadii* sowohl auf eine hohe Natriumchloridkonzentration wie auch auf einen hohen pH-Wert angewiesen. Konkret liegt optimales Wachstum bei etwa 4 M NaCl und einem pH-Wert zwischen 8,5 und 11 vor, wobei gleichzeitig die ausreichende Oxygenierung des Mediums gewährleistet sein muss, da *Nab. magadii* strikt aerob ist. Sind diese Bedingungen sowie gleichbleibende Temperaturen zwischen 37 und 42 °C gegeben, beträgt die Verdoppelungszeit während der logarithmischen Wachstumsphase etwa neun Stunden (Tindall *et al.*, 1984; Derntl 2009). Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,2

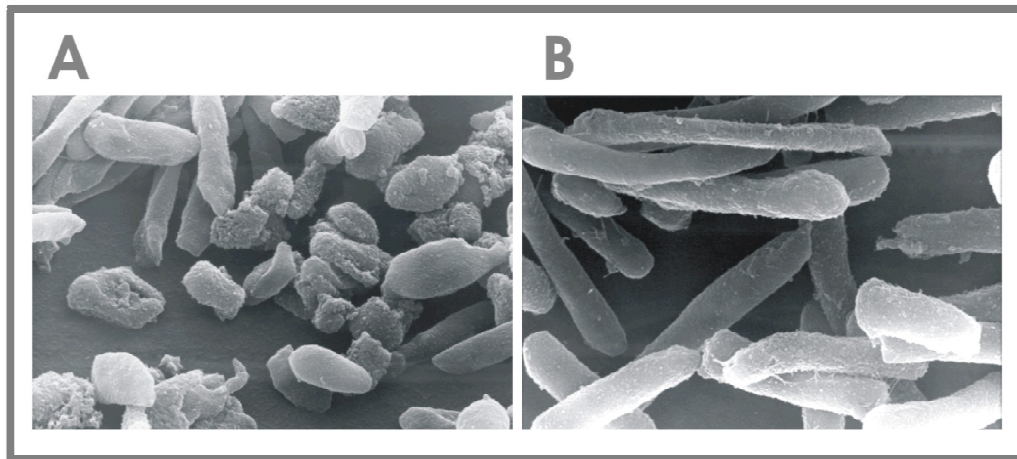


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Nab. magadii*

A zeigt den Wildtyp *Nab. magadii* L11, welcher den Phagen ϕ Ch1 trägt. In B ist *Nab. magadii* L13 zu sehen. Dieser Stamm trägt keinen Provirus mehr und kann als Indikator für eine Infektion mit ϕ Ch1 verwendet werden. Grafik und Text aus Reiter, 2010.

bis 2 stellt sich stationäres Wachstum ein. Diese Werte können in Mineralmedium auch überschritten werden. Weiters ist zu bemerken, dass *Nab. magadii* die genannten Salzkonzentrationen nicht nur toleriert, sondern explizit benötigt, da bei einer NaCl-Konzentration unter 2 M spontane Lyse auftritt (Tindall *et al.*, 1984).

Die heute im Labor verwendeten Stämme *Nab. magadii* L11 und L13 gingen aus den Untersuchungen rund um die Entdeckung des Phagen ϕ Ch1 von Witte *et al.* im Jahr 1997 hervor. Für beide Stämme wurde die Identität als *Nab. magadii* durch Sequenzierung im Bereich der 16S rRNA bestätigt. Der lysogene Stamm *Nab. magadii* L11 entspricht dem Wildtyp, er trägt ϕ Ch1 als Prophagen (Informationen zu ϕ Ch1 in Abschnitt 1.3). *Nab. magadii* L13 ist nicht lysogen und kann durch ϕ Ch1 infiziert werden, da dieser Stamm keinen Provirus trägt. *Nab. magadii* L13 dient daher als Indikatorstamm (Witte *et al.*, 1997).

1.2.1 Natrialba extrazelluläre Protease (NEP)

Die NEP ist ein halophiles Protein, dessen höchste Aktivität bei 1,5 M NaCl, 60 C und einem pH-Wert zwischen 8 und 10 gegeben ist. Dies reflektiert den Umstand, dass die Protease von *Nab. magadii* in der späten logarithmischen Wachstumsphase in das umgebende Medium segregiert

Einleitung

wird und daher eine NaCl-Konzentration um etwa 4 M sowie einem pH-Wert zwischen 8,5 und 11 ausgesetzt ist (Giménez *et al.*, 2000).

Um die Aktivität der NEP zu bestimmen, stehen zwei Methoden zur Verfügung: Ausstrich auf Agarplatten, denen Casein hinzugefügt wurde, oder ein Azocasein-Assay. Die durch das enthaltene Casein trüben Platten werden im Umfeld von Kolonien, welche NEP segregieren, zusehends klar. Es kommt zur Bildung eines klaren Hofs, dessen Größe einen Anhaltspunkt für Schätzungen der Aktivität bildet (Wang *et al.*, 2007). Beim Azocasein-Assay wird die kovalente Bindung zwischen Casein und Azo-Reagens durch die NEP gespalten, wodurch die Lösung orange gefärbt wird. Die Intensität der Färbung kann photometrisch quantifiziert und aus deren Zunahme die Aktivität berechnet werden. Während der Ausstrich fast ausschließlich eine Ja-Nein-Aussage erlaubt, ist mit dem Azocasein-Assay eine effektive Quantifizierung der Aktivität möglich (Wang *et al.*, 2007; Giménez *et al.*, 2000).

1.2.2 Flagellum

Äußerlich ähneln archaeale Flagella jenen von Bakterien: Es handelt sich um rotierende Strukturen, welche über einen Haken in der Zellwand verankert sind und deren Rotationsrichtung durch chemische Prozesse intrazellulär reguliert werden kann. Jedoch sind die archaealen Varianten mit einem Durchmesser von 10 bis 12 nm deutlich dünner als jene von Bakterien (Thomas *et al.*, 2001). Während sich bakterielle Flagella hauptsächlich aus einem einzigen Typ Protein zusammensetzen, bestehen archaeale Flagella aus mehreren.

Die Bildung des Flagellums ist nicht geklärt, jedoch gibt es Indizien: "*Based in the lack of a central channel and the similarities to T4P, archaeal flagella have been predicted to assemble at the base*" (Jarrell und McBride, 2008). Diese Annahme wird durch Untersuchungsergebnisse eines *Methanococcus-maripaludis*-Stammes, welcher aufgrund eines Defekts des flab3-Gens Filamente ohne die Hakenstruktur produziert, unterstützt. Dies indiziert, dass der Haken als letztes gebildet wird (Jarrell und McBride, 2008).

Das Flagellin-Operon von *Nab. magadii* (siehe Abbildung 8) besteht aus vier respektive fünf aufeinanderfolgenden ORFs, von denen die ersten vier unter Kontrolle eines gemeinsamen

Einleitung

Promotors stehen. Die Zugehörigkeit des fünften ORFs ist nicht gesichert (Serganova *et al.*, 2002). In der zitierten Arbeit konnte nicht nur das Operon identifiziert und charakterisiert werden, es war ebenfalls möglich, den ORFs die bereits zuvor untersuchten Proteine des Flagellums zuzuordnen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Produkte der ORFs 1 und 2 (genannt FlaB1 und FlaB2) glykosyliert sind (Serganova *et al.*, 2002). Diese Erkenntnis ist für die gegenständliche Diplomarbeit von Bedeutung, da sich im vermuteten Tail-fibre-Protein (siehe Abschnitt 1.3.4) des Phagen ϕ Ch1 eine Galaktosebindungsdomäne findet, welche eine mögliche Interaktionsstelle zwischen Phagen und Wirt darstellt.

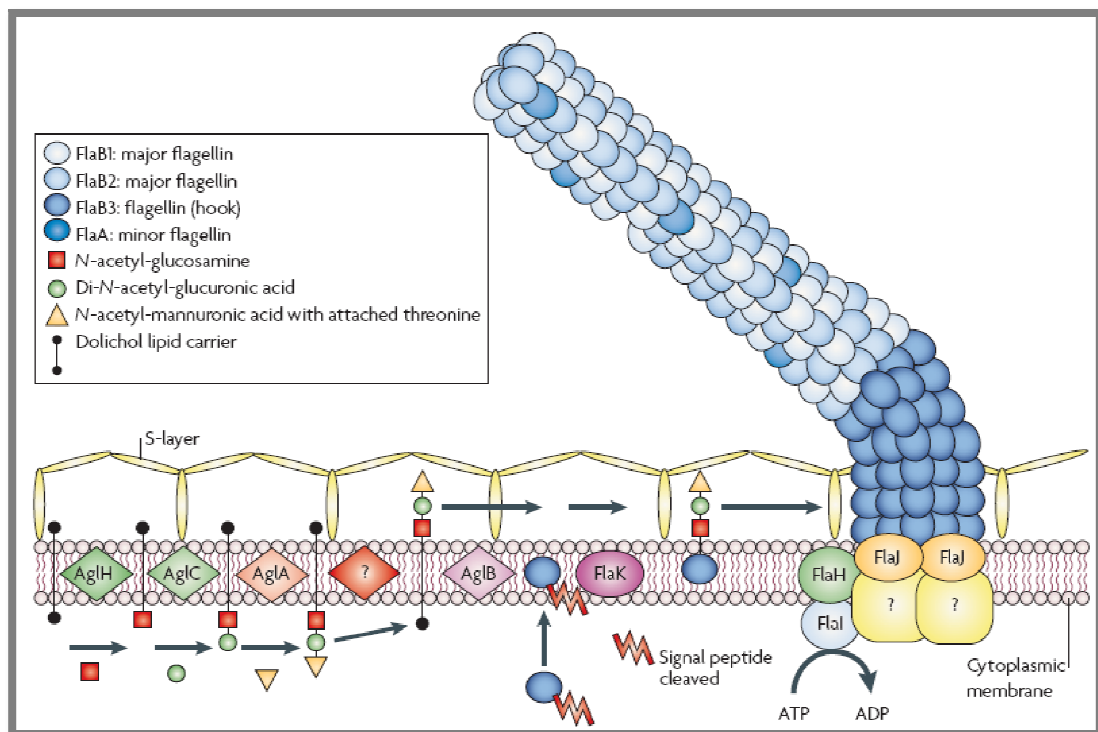


Abbildung 3: Modell eines archaealen Flagellums

Die Abbildung zeigt ein Modell der Struktur wie auch der Zusammensetzung eines archaealen Flagellums. Es wird vermutet, dass die Untereinheiten an der Basis gebildet werden. Weiters ist zu bemerken, dass post-transkriptionale Modifikationen wie etwa Glykosylierungen dokumentiert wurden. Grafik und Text aus Jarrell und McBride, 2008

Einleitung

1.2.3 Transformation von *Nab. magadii*

Bereits etablierte Transformationsmethoden, wie sie im „Halohandbook“ (Dyall-Smith, 2009) angeführt sind, scheiterten bei *Nab. magadii* an der hohen Stabilität der S-Schicht. Während diese bei anderen Spezies durch den Zusatz von EDTA hinreichend destabilisiert wird, um die Bildung von Spheroplasten zu ermöglichen, reicht dies bei *Nab. magadii* nicht aus. Dieses Problem konnte im Labor von Angela Witte durch Verwendung einer Kombination von Bacitracin und Proteinase K einer Lösung zugeführt werden. In dieser Form war es möglich, ein effizientes PEG-vermitteltes Transformationssystem für *Nab. magadii* zu etablieren (Iro *et al.*, in Vorbereitung).

1.3 ϕ Ch1 – ein Halophage

1.3.1 Archaeale Viren – ein kurzer Überblick

Verglichen mit der Vielzahl jener Viren, welche Wirte aus der Domäne der *Bacteria* infizieren, ist die Zahl der bekannten archaealen Viren sehr begrenzt. Im Juni 2010 listete die NCBI-Genome-Website insgesamt 580 Phagen, von denen lediglich 32 Viren von *Archaea* darstellen. Dennoch gibt es „[...] every reason to assume that viruses of the Archaea are as numerous and diverse as those of the Bacteria“ (Clokier *et al.*, 2011). Die meisten dieser Viren besitzen ein doppelsträngiges Erbgut aus DNA mit einer Größe zwischen 10 und 100 kbp sowie einem oftmals hohen „G+C“-Gehalt, welcher die Verhältnisse im Wirt reflektiert (Pietilä *et al.*, 2009; Prangishvili *et al.*, 2006). Üblicherweise ist dieses Genom linear ausgeführt und verbleibt im Fall von crenarchaealen Viren ohne Integration im Genom des Wirts im Cytoplasma (Häring *et al.*, 2005a). Bei euryarchaealen Viren wurde bereits die Integration des viralen Erbguts in jenes des Wirts dokumentiert (Witte *et al.*, 1997).

Einleitung

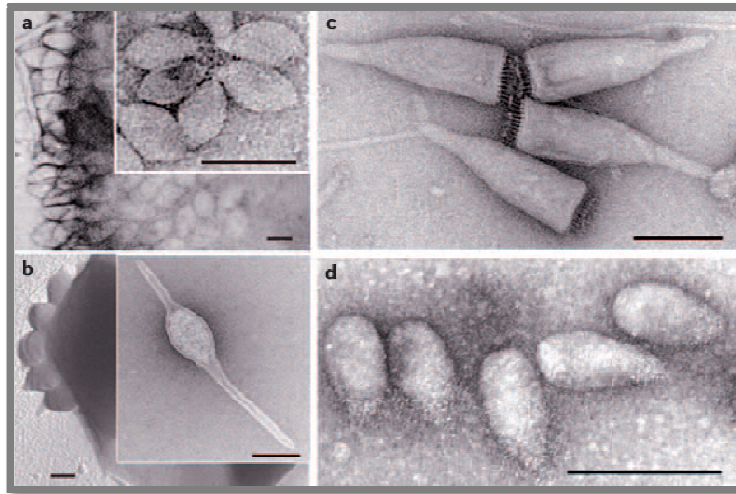


Abbildung 4: Morphologien von archaealen Viren

a| *Sulfolobus* spindle-shaped Virus 1 (SSV1)

b| *Acidianus* two-tailed Virus (ATV)

c| *Acidianus* bottle-shaped Virus (ABV)

d| *Sulfolobus neozealandicus* droplet-shaped Virus (SNDV)

Die Balken repräsentieren jeweils 100 nm.

Grafik und Text aus Prangishvili *et al.*, 2006

Nicht zuletzt aufgrund der besiedelten Habitate, die mitunter extreme Bedingungen aufweisen, zeigen archaeale Viren eine Vielzahl von besonderen Morphologien. Speziell sind hierbei die crenarchaealen Viren zu nennen (Häring *et al.*, 2005a), siehe dazu auch Abbildung 4. Im Gegensatz dazu weisen euryarchaeale Viren meist eine klassische Kopf-Schwanz-Morphologie auf, weshalb sie zu den Familien *Myoviridae* und *Siphoviridae* gezählt werden (Prangishvili *et al.*, 2006). Zu den weiteren dokumentierten Morphologien zählen unter anderem das fusiforme („lemon-shaped“) halophile Virus His1 (Bath und Dyll-Smith, 1998).

1.3.2 Generelle Informationen über ϕ Ch1

ϕ Ch1 ist ein temperenter Virus, welcher zwischen lytischem und lysogenem Status wechselt (Witte *et al.*, 1997). Morphologisch handelt es sich um einen Kopf-Schwanz-Phagen aus der Familie der *Myoviridae*, dessen ikosaedrischer Kopf einen Durchmesser von 70 nm aufweist. Der Schwanz besteht aus einem Schaft, welcher von einem kontraktilen Gebilde umgeben ist. Die Länge des Schwanzes beträgt 130 nm, der Durchmesser etwa 20 nm. Dies ergibt eine Gesamtlänge von etwa 200 nm. Am kopf-fernen Ende des Schwanzes befinden sich so genannte

Einleitung

Tail-fibres, denen eine Rolle bei der Adsorption an den Wirt zugeschrieben wird (siehe auch Abschnitt 1.3.4).

Der einzige bekannte Wirt von ϕ Ch1 ist das haloalkaliphile Archaeon *Nab. magadii*, dessen Beschreibung sich in Abschnitt 1.2 findet (Witte *et al.*, 1997). Die Isolation des Phagen gelang aus dem lysogenen Stamm *Nab. magadii* L11. Gleichzeitig wurde infolge wiederholter Subkultivierung und Untersuchung von Einzelkolonien auf Sensibilität für die Infektion der Stamm *Nab. magadii* L13 isoliert. Eine Superinfektion konnte nicht beobachtet werden, ähnlich den Ergebnissen aus *Hbt. Salinarum* R₁-3 und R₁-24 (Stolt und Zillig, 1992).

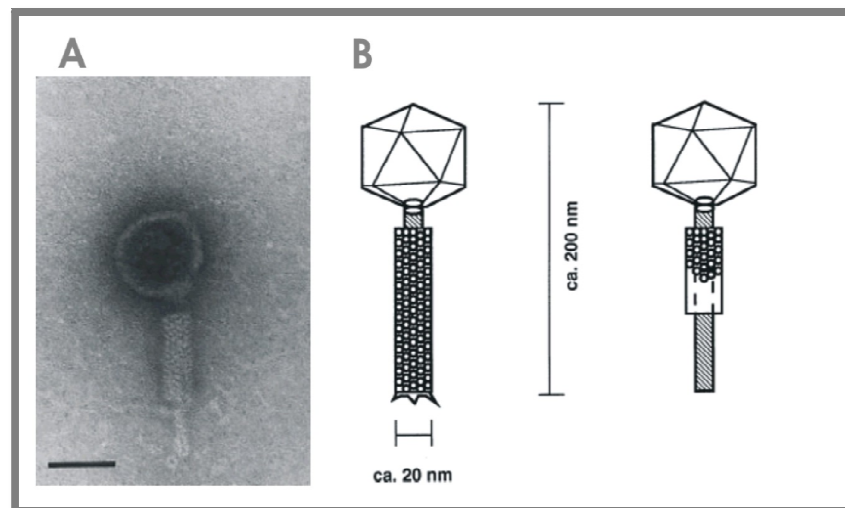


Abbildung 5: Morphologie von ϕ Ch1

A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Phagenpartikels. In dieser Grafik ist die Kopf-Schwanz-Morphologie klar erkennbar, der Schwanz ist kontrahiert. Der Balken repräsentiert 50 nm.

B zeigt eine schematische Darstellung von ϕ Ch1, rechts mit kontrahiertem Schwanz.

Grafik und Text adaptiert aus Witte *et al.*, 1997

Das Genom von ϕ Ch1 besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, deren hoher „G+C“-Anteil von knapp 62 % jenen seines Wirts widerspiegelt (Tindall *et al.*, 1984) und ist „[...] terminally redundant and circularly permuted and therefore appears to be packaged by the so-called headful mechanism“ (Klein *et al.*, 2002). Weiters zeigten Restriktionen, dass die DNA teilweise

Einleitung

methyliert ist. Als verantwortliches Enzym konnte die Methyltransferase M. ϕ Ch1-I identifiziert werden (Baranyi *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Phagenpartikel von ϕ Ch1 neben dem Genom auch RNA mit einer Größe von 80 bis 700 Nukleotiden enthalten. Deren Funktion ist bislang ungeklärt (Witte *et al.*, 1997).

Als Halophage ist ϕ Ch1 von hoher Salinität im ihn umgebenden Medium abhängig, da bei Konzentrationen von weniger als 2 M NaCl Verlust der Infektivität auftritt. Die Untersuchung dieser Abhängigkeit wurde durch Dialyse der isolierten Phagenpartikel gegen Lösungen mit NaCl-Konzentrationen zwischen 1 und 4 M mit anschließender Analyse der Infektivität durchgeführt (Witte *et al.*, 1997). Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen bei anderen Phagen, welche halophile Spezies infizieren. Üblicherweise sind diese an die physiologische Situation ihres Wirts angepasst, benötigen also ebenfalls hohe Salzkonzentrationen und zeigen einen vergleichsweise langsamen Wachstumszyklus (Schnabel *et al.*, 1982; Gropp *et al.*, 1989).

1.3.3 Organisation des Genoms

Das Genom des Phagen ϕ Ch1 umfasst 58 kbp und wird in einen linken, einen mittleren und einen rechten Teil unterteilt. Im linken sowie im rechten Teil des Genoms ergibt sich für alle enthaltenen ORFs die gleiche Leserichtung: Für den linken Teil (ORFs 1-34) ist dies rechtsgerichtet, die ORFs kodieren – soweit bekannt – für Strukturproteine bzw. für das Packen des Virus. Der rechte Teil (ORFs 56-98) ist ebenfalls rechtsgerichtet kodiert, den meisten beinhaltenen ORFs konnte mittels BLAST keine vermutete Funktion zugeordnet werden. Eine Ausnahme hiervon stellt der ORF94 dar, welcher für die Methyltransferase M. ϕ Ch1I kodiert (Baranyi *et al.*, 2000). Im mittleren Teil des Genoms (ORF 35-55) finden sich ORFs beider Leserichtungen, unter anderem mit den ORFs 53 und 54 der Replikationsursprung (Klein *et al.*, 2002).

Die Voraussage der ORFs basiert auf der Suche nach den Startcodons ATG bzw. GTG, gefolgt von mindestens 30 Codons ohne Auftreten eines Stopp-Codons. Bis auf ORF3, 41, 79 und 83 beginnen alle berechneten 98 ORFs mit ATG. Auffallend ist, dass viele ORFs direkt an die benachbarten anschließen respektive eine Überlappung von wenigen Basenpaaren aufweisen.

Einleitung

Dies wird als Indiz für die Organisation des Genoms in transkriptionellen Einheiten interpretiert, welche gemeinsam reguliert werden (Klein *et al.*, 2002).

Zwei ORFs, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, werden nachfolgend detaillierter besprochen.

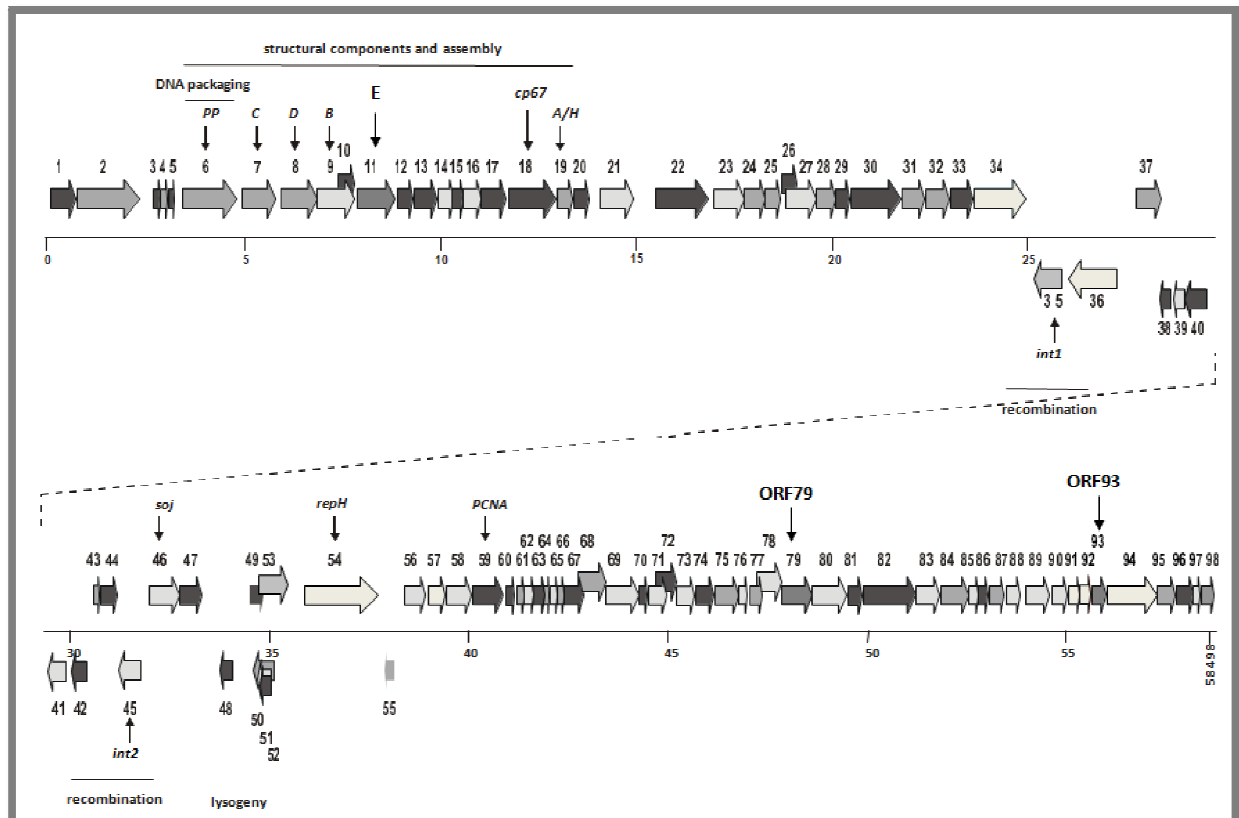


Abbildung 6: Genom des Phagen ϕ Ch1

Darstellung des Genoms des Phagen ϕ Ch1 mit den berechneten ORFs. Das Genom ist in einen linken, mittleren und rechten Teil organisiert, die jeweils die ORFs 1-34, 35-55 bzw. 56-98 enthalten. Jene ORFs, die in der gegenständlichen Arbeit eingehender untersucht wurden (E, ORF79 und ORF93), sind durch die Beschriftung hervorgehoben.

Grafik und Text modifiziert aus Klein *et al.*, 2002

Einleitung

1.3.4 Ausgewählte ORFs

ORF11 – Protein E

Der ORF11 kodiert für das Hauptkapsidprotein E (Klein *et al.*, 2000). Seine Länge beträgt 966 bp, die sich im Genom von Nukleotid 7756 bis 8721 erstrecken. Durch den niedrigen isoelektrischen Punkt von 3,74, hervorgerufen durch einen für halophile Proteine, typischen Überschuss an acidischen Aminosäuren, wird bei SDS-PAGE ein höheres Gewicht vorgetäuscht als tatsächlich vorhanden. Berechnet wurde ein Gewicht von 35,8 kDa (Klein *et al.*, 2000 und 2002). Neben Protein E existieren die Proteine A, H und I als weitere Haupt- sowie B, C, D, F und G als Nebenkapsidproteine. Alle weisen einen sauren isoelektrischen Punkt auf, ihre Größen liegen zwischen 15 und 80 kDa (Witte *et al.*, 1997).

In *Nab. magadii* L11 kann die Expression des Proteins mittels Western Blot etwa 24 Stunden vor Beginn der Lyse detektiert werden. Bei frisch infizierten Kulturen ist dies bereits früher der Fall. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Phage direkt in den lytischen Zyklus eintritt. Protein E kann im Zeitfenster zwischen Expression und Lyse hauptsächlich an der Membran von *Nab. magadii* nachgewiesen werden. Dort kommt es zur Spaltung des Proteins (Klein *et al.*, 2000). Diese Spaltung dürfte im Zusammenhang mit dem Loslösen der fertigen Phagenpartikel stehen (Siegel und Schaechter, 1973).

ORF34

Zwischen ORF34 und ORF36 befindet sich der ORF35, welcher für die site-spezifische Rekombinase Int1 kodiert. Innerhalb der ORF34 und 36 finden sich jeweils mehrere direkte Wiederholungen von jeweils einigen Basenpaaren Länge. Diese Cluster sind in invertierter Richtung zueinander positioniert (Klein *et al.*, 2002; Rössler *et al.*, 2004). Durch Int1 kommt es an diesen Stellen zu einer Inversion, woraus der Austausch der 3'-Enden der ORF34 und 36 resultiert. Die entstehenden Produkte tragen die Bezeichnung gp34₅₂ respektive gp36₅₂, wobei das gp34₅₂ eine Galaktosebindungsdomäne enthält,

Einleitung

welche für die Adsorption des Phagen an den Wirt *Nab. magadii* verantwortlich sein könnte (Rössler *et al.*, 2004).

In rezenten Untersuchungen wurde gezeigt, dass der ORF34 ausschlaggebend für die Infektion von *Nab. magadii* durch den Phagen ist. Die Deletionsmutante $\phi\text{Ch1-}\Delta\text{ORF34}$ besitzt keine Infektivität, erlangt diese jedoch durch Komplementation mit einem Plasmid, welches den ORF34₅₂ trägt, in eingeschränktem Maß wieder (Till, 2011).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Verwendete Stämme

Bakterienstamm	Charakteristika	Quelle
<i>E. coli</i> XL-1-Blue	<i>endA1, gyrA96, hsdR17 (r_k-m_k⁺), lac, recA1, relA1, supE44, thi, (F', lacI^q, lacZΔM15, proAB⁺, tet)</i>	Stratagene, s. a.
Archaeastamm	Charakteristika	Quelle
<i>Nab. magadii</i> L11	wt, ϕCh1 als Prophage	Witte <i>et al.</i> , 1997
<i>Nab. magadii</i> L13	<i>Nab. magadii</i> ohne ϕCh1 als Prophagen	Witte <i>et al.</i> , 1997
<i>Nab. magadii</i> P3	L13, NEP unterbrochen durch NovR	Derntl, 2009
<i>Nab. magadii</i> L11Δ79	Virus ϕCh1: Deletion von ORF79 durch Austausch gegen NovR	Selb, 2010

2.1.2 Antibiotika und Zusätze

Antibiotikum	Endkonzentration	Stamm	Generelles
Ampicillin	100 µg/ml	<i>E. coli</i>	Gelöst in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C
Tetracyclin	10 µg/ml	<i>E. coli</i>	Gelöst in 50 % Ethanol, Lagerung bei -20 °C, lichtempfindlich
Novobiocin	3 µg/ml	<i>Nab. magadii</i>	Gelöst in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, lichtempfindlich
Mevinolin	7,5 µg/ml	<i>Nab. magadii</i>	Gelöst in 96 % Ethanol, Lagerung bei -20 °C
Bacitracin	70 µg/ml	<i>Nab. magadii</i>	Gelöst in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

Material und Methoden

Zusatz	Endkonzentration	Stamm	Generelles
IPTG	0,5 mM	<i>E. coli</i>	Gelöst in ddH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Tryptophan	2 mM	<i>Nab. magadii</i>	Gelöst in 1M NaOH, Lagerung bei -20 °C, lichtempfindlich

2.1.3 Primer

Primer	Sequenz	Schnittstelle
Tna-N-1	GAT TAA GCT TCT GAG GAA TCG ACC GGT T	<i>HindIII</i>
Tna-N-2	GAA CGG ATC CCA TAT GTA GCA ACT CGA GAA CGC C	<i>BamHI/NdeI</i>
93-5-Nde	GAT CCA TAT GAC GAC GAT GAT TGA TCC	<i>NdeI</i>
93-3-Kpn	GAT CGG TAC CTC AGT GAA CGT TGT CCG AC	<i>KpnI</i>
93-3-Bgl	GAT CAG ATC TTC AGT GAA CGT TGT CCG AC	<i>BglII</i>
Hfx-Tna	GAC CGC GAG GAG ACG	-
BgaH-3i	GAG TGA AAA ACC ACC CAT	-
Nov9	GAT GTC GGT CAT CGC GG	-
E-HB-51	CAG CAG TCT AGA CCA GGC GGT GGC	<i>XbaI</i>
E-HB-3	GAC GAC AAG CTT TCA GCC ATC GTT CAC C	<i>HindIII</i>
Nov-6	GGG ATC GCA GAG GAG C	-
FlaB1-1	CAG CAA GAT CTA TGT TCG AAC AAA ACG ACG	<i>BglII</i>
FlaB2-1	GAC CGG ATC CAT GTT CAC TAA CGA CAC CGA	<i>BamHI</i>
FlaB3-2	CAG GAA GCT TAT AGC CTC ACA GAT TCG TCA	<i>HindIII</i>
79-Pst	GAT ACT GCA GCT CTT TGT ACC GAT GCG TC	<i>PstI</i>
79-Bgl	GAT AAG ATC TAT GGT CGA AGT GAC GAA CC	<i>BglII</i>
36-3	CAG CAG AAG CTT ATT CAG GTT TCA TGT CGC TG	<i>HindIII</i>
34-XbaI-a	GAC GTC TAG ACT CCG ATG AAC ACG ACA CTC	<i>XbaI</i>
NB-1	TCT ACC GGG TGC TGA ACG	-
NB-2	CGC TGA TGT ACG AAC CGA G	-

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pUC19	<i>bla</i> , pMB1ori, <i>lacZα</i> , mcs	Yanisch-Perron, Vieira und Messing, 1985
pKS _{II} ⁺	<i>bla</i> , colE1 ori, <i>lacZα</i> , mcs	Stratagene, s. a.

Material und Methoden

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pNB102	<i>bla</i> , ColE1 ori, <i>hmg</i> (<i>mev</i> ^R), pNB101 ori	Zhou <i>et al.</i> , 2004
pBAD24	<i>bla</i> , pBR322 ori, <i>araC</i> , <i>mcs</i>	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pRo5	<i>bla</i> , ColE1 ori, <i>gyrB</i> , ori aus ϕ Ch1	Iro <i>et al.</i> , in Vorbereitung
pPRV1- <i>ptna</i>	<i>ptna</i> <i>Hfx. volcanii</i> , <i>bgaH</i> , <i>gyrB</i> , pHK2, pMB1, <i>bla</i>	M. Dyall-Smith
pKS _{II} ⁺ (delta) <i>flaB2::novR</i> (772)	pKS _{II} ⁺ , <i>fla</i> -Gen aus <i>Nab. magadii</i> unterbrochen durch <i>gyrB</i>	Labor Angela Witte
pKS- <i>flaB1-2-NovR-flaB3-4</i> (1090)	pKS _{II} ⁺ , <i>fla</i> -Gen aus <i>Nab. magadii</i> im ORF 2 unterbrochen durch <i>gyrB</i>	Labor Angela Witte
pKS _{II} ⁺ gpE (842)	pKS _{II} ⁺ mit gpE aus ϕ Ch1	Labor Angela Witte
pQE-C-term-prt (985)	pQE-30, C-Terminus der <i>Nab. magadii</i> Protease mit His-Tag	Labor Angela Witte
pNB102-prt (837)	pNB102 mit NEP-Gen (<i>prt</i>) aus <i>Nab. magadii</i> inklusive zugehörigem Promotor	Derntl, 2009
pUC19-prom-ORF49 (955)	pUC19 mit Promotor des ORF49 von ϕ Ch1	Labor Angela Witte
pRo5-prom <i>tna</i> (1052)	pRo5 mit Tryptophanasepromotor (<i>tna</i>) aus <i>Haloferax volcanii</i>	Diese Arbeit
pBAD24- <i>tnaN</i> (1065)	pBAD24 mit Tryptophanasepromotor (<i>tnaN</i>) aus <i>Nab. magadii</i>	Diese Arbeit
pRo5- <i>tna-bgaH</i> (1084)	pRo5 mit <i>tna</i> -Promotor aus <i>Hfx. volcanii</i> und <i>bgaH</i> -Gen	Diese Arbeit
pBAD24- <i>tnaN</i> -ORF93 (1086)	pBAD24 mit <i>tnaN</i> -Promotor aus <i>Nab. magadii</i> und ORF93 aus ϕ Ch1	Diese Arbeit
pBAD24- <i>tnaN-bgaH</i> (1088)	pBAD24 mit <i>tnaN</i> -Promotor aus <i>Nab. magadii</i> und <i>bgaH</i> -Gen	Diese Arbeit
pRo5- <i>tnaN-bgaH</i> (1093)	pRo5 mit <i>tnaN</i> -Promotor aus <i>Nab. magadii</i> und <i>bgaH</i> -Gen	Diese Arbeit
pRo5- <i>tnaN</i> -ORF93 (1094)	pRo5 mit <i>tnaN</i> -Promotor aus <i>Nab. magadii</i> und ORF93 aus ϕ Ch1	Diese Arbeit
pUC19-prom49-ORF79 (1117)	pUC19 mit Promotor des ORF49 und ORF79 (beide aus ϕ Ch1)	Diese Arbeit
pNB102 -prom49-ORF79 (1140)	pNB102 mit Promotor des ORF49 und ORF79 (beide aus ϕ Ch1)	Diese Arbeit

In Klammer ist die Nummer des Plasmids in der laboreigenen Stammsammlung angeführt.

Material und Methoden

2.1.5 Medien

Alle Angaben beziehen sich jeweils auf 1 L fertiges Medium.

2.1.5.1 LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen, einstellen auf pH-Wert 7,0	
Für Platten 15 g Agar zugeben	

2.1.5.2 Vollmedium für haloalkaliphile Archaea: *Natrialba* Vollmedium NVM⁺

Casaminoacids	8,80 g
Hefeextrakt	11,70 g
Tri-Natriumcitrat	0,8 g
Kaliumchlorid	2,35 g
Natriumchlorid	235 g
Mit dH ₂ O auf 935 ml auffüllen, einstellen auf $9 \leq \text{pH} \leq 9,5$	
Für Platten 8 g Agar zugeben, für Softagar 4 g Agar	

Nach dem Autoklavieren wird das Medium bzw. der Agar mit folgenden Lösungen komplettiert:

0,57 M Na ₂ CO ₃ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	63 ml
1 M MgSO ₄ (autoklaviert)	1 ml
20 mM FeSO ₄ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	1 ml

Material und Methoden

2.1.5.3 Definierte Medien für haloalkaliphile Archaea

2.1.5.3.1 Natrialba Mineralmedium NMM⁺

Natriumchlorid	205 g	3,5 M
Kaliumchlorid	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	0,28 g	2 mM
NaH ₂ PO ₄	0,28 g	2 mM
Alanin	2,23 g	25 mM
Leucin	0,66 g	5 mM
Natriumacetat	1,66 g	20 mM
Natriumpyruvat	1,1 g	10 mM

Mit dH₂O auf 900 ml auffüllen, einstellen auf $9 \leq \text{pH} \leq 9,5$

Für Platten 8 g Agar zugeben

Nach dem Autoklavieren wird das Medium bzw. der Agar mit folgenden Lösungen komplettiert:

1,75 M Na ₂ CO ₃ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	100 ml
1 M MgSO ₄ (autoklaviert)	1 ml
20 mM FeSO ₄ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	250 µl
1000x Spurenelemente	1 ml

2.1.5.3.2 Natrialba Mineralmedium NMMa⁺

Natriumchlorid	205 g	3,5 M
Kaliumchlorid	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	0,28 g	2 mM
NaH ₂ PO ₄	0,28 g	2 mM
NH ₄ Cl	0,64 g	12 mM
Leucin	0,66 g	5 mM
Natriumacetat	1,66 g	20 mM
Natriumpyruvat	1,1 g	10 mM

Material und Methoden

Mit dH₂O auf 900 ml auffüllen, einstellen auf $9 \leq \text{pH} \leq 9,5$

Für Platten 8 g Agar zugeben

Nach dem Autoklavieren wird das Medium bzw. der Agar mit folgenden Lösungen komplettiert:

1,75 M Na ₂ CO ₃ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	100 ml
1 M MgSO ₄ (autoklaviert)	1 ml
20 mM FeSO ₄ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	250 µl
1000x Spurenelemente	1 ml

2.1.5.3.3 Natrialba Mineralmedium NMMb⁺

Natriumchlorid	205 g	3,5 M
Kaliumchlorid	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	0,28 g	2 mM
NaH ₂ PO ₄	0,28 g	2 mM
Alanin	2,23 g	25 mM
Leucin	0,66 g	5 mM
Arginin	0,81 g	5 mM
Histidin	0,778 g	5 mM
Lysin	0,731 g	5 mM
Tri-Natriumcitrat	0,8 g	2,7 mM
Natriumacetat	1,66 g	20 mM
Natriumpyruvat	1,1 g	10 mM

Mit dH₂O auf 900 ml auffüllen, einstellen auf $9 \leq \text{pH} \leq 9,5$

Für Platten 8 g Agar zugeben

Nach dem Autoklavieren wird das Medium bzw. der Agar mit folgenden Lösungen komplettiert:

1,75 M Na ₂ CO ₃ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	100 ml
1 M MgSO ₄ (autoklaviert)	1 ml
20 mM FeSO ₄ (gelöst in sterilem dH ₂ O)	250 µl
1000x Spurenelemente	1 ml

Material und Methoden

2.1.5.3.4 1000x Spurenelemente

MnCl ₃	93 mg	4 mM
CaCl ₂	44 mg	3 mM
CuSO ₄	64 mg	4 mM
ZnSO ₄	86 mg	3 mM

Mit dH₂O auf 100 ml auffüllen

2.1.6 Puffer und Lösungen

In diesem Abschnitt werden die jeweils für eine Methode benötigten Puffer bzw. Lösungen beschrieben.

2.1.6.1 Herstellen kompetenter Zellen

2.1.6.1.1 *E. coli*

MOPS I

MOPS	100 mM
Kalziumchlorid	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
pH 7,0 mit Kaliumhydroxid	

MOPS II

MOPS	100 mM
Kalziumchlorid	70 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
pH 6,2 mit Kaliumhydroxid	

MOPS IIa

MOPS	100 mM
Kalziumchlorid	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
Glycerol	15 %

2.1.6.1.2 *Nab. magadii*

Buffered High Salt Spheroblasting Solution (mit bzw. ohne Glycerol)

Natriumchlorid	2 M
Kaliumchlorid	27 mM
Tris-HCl pH 8,2	50 mM
Sucrose	15 %
(Glycerol	15 %)

Unbuffered High Salt Spheroblasting Solution

Natriumchlorid	2 M
Kaliumchlorid	27 mM
Sucrose	15 %
0,5 M EDTA (steril)	

Material und Methoden

2.1.6.2 Proteinmethoden

2.1.6.2.1 SDS-PAGE und Western Blot

30 % AA-Lösung (29:1)

Acrylamid	29 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	1 %

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

Trizma Base	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 %

4x Trenngelpuffer

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 %

4x Sammelgelpuffer

Tris-HCl pH 6,8	1,5 M
SDS	0,4 %

2x Laemmliprobeppuffer

Tris-HCl pH 6,8	0,12 mM
SDS	4 %
Glycerol	17,4 %
β -Mercapto-Ethanol	2 %
Bromphenolblau	0,02 %

Coomassie-Färbelösung

Methanol	25 %
Essigsäure	10 %
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,15 %

Ponceau-S Färbelösung

Ponceau-S	0,5 %
TCA	3 %

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol	25 %
Essigsäure	10 %

Transblottpuffer

Trizma Base	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037 %
Methanol	20 %

10x TBS

Tris-HCl pH 8	0,25 M
Natriumchlorid	1,37 M
Kaliumchlorid	27 mM

5 mM Natriumphosphatpuffer

0,2 M NaH_2PO_4	2,55 ml
0,2 M Na_2HPO_4	2,45 ml
ddH ₂ O	Ad 200 ml

Blocklösung

1x TBS	50 ml
Magermilchpulver	5 %

Material und Methoden

2.1.6.2.2 Denaturierende Proteinaufreinigung

Puffer B

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Harnstoff	8 M
pH 8,0 mit Natriumhydroxid	

Puffer C

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Harnstoff	8 M
pH 6,3 mit HCl	

Puffer E

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Harnstoff	8 M
pH 4,5 mit HCl	

10x PBS

Natriumchlorid	8 %
Kaliumchlorid	0,2 %
NaH ₂ PO ₄	1,44 %
Na ₂ HPO ₄	0,24 %
pH 7,4	

2.1.6.3 DNA

2.1.6.3.1 Gelelektrophorese

50x TAE

Tris-HCl pH 8,2	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	0,1 M

5x DNA-Auftragspuffer

Tris-HCl pH 8,2	50 mM
SDS	0,1 %
Bromphenolblau	0,05 %
Xylene Cyanol	0,05 %
Nach dem Autoklavieren 25 % Sucrose zugeben	

10x TBE

Trizma Base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA pH 8	0,5 M
pH 8,0 einstellen mit Borsäure, auffüllen mit ddH ₂ O auf 1 l	

6 % Polyacrylamidgel

30 % Acrylamid (29:1)	1,2 ml
1x TBE	4,8 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl

Material und Methoden

2.1.6.3.2 Southern Blot

50x Denhardts Lösung

Ficoll 400	1 g
Polyvinylpyrrolidon	1 g
BSA	1 g
Auffüllen mit ddH ₂ O auf 100 ml	
Lagerung bei -20 °C	

Hybridisierungspuffer

ddH ₂ O	60 ml
20x SSC	25 ml
50x Denhardts Lösung	10 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	5 ml
20 % SDS	500 µl
0,5 M EDTA	200 µl
BSA	0,5 g
Lagerung bei -20 °C	

20x SSC

Natriumchlorid	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,2	

Waschlösung I

1:10 Verdünnung der Blocklösung

10x Waschlösung II

Trizma Base	12,1 g
Natriumchlorid	5,85 g
Magnesiumchlorid	2,03 g
pH 9,5 einstellen mit NaOH/HCl,	
auffüllen mit ddH ₂ O auf 1 l	

Blockierlösung

Natriumchlorid	7,3 g
NaH ₂ PO ₄	0,96 g
Na ₂ HPO ₄	2,41 g
SDS	50 g
pH 7,2, auffüllen mit ddH ₂ O auf 1 l	

2.1.6.4 Lösungen und Puffer für haloalkaliphile Archaea

2.1.6.4.1 Isolierung von ϕ Ch1

Puffer B₁

Natriumchlorid	4 M
Tris-HCl pH 9,5	50 mM

Lösung 1.1

Natriumchlorid	2 M
Tris-HCl 8,5 ≤ pH ≤ 9,5	50 mM
Cäsiumchlorid	0,6 M

Lösung 1.3

Natriumchlorid	2 M
Tris-HCl 8,5 ≤ pH ≤ 9,5	50 mM
Cäsiumchlorid	3,7 M

Lösung 1.5

Natriumchlorid	2 M
Tris-HCl 8,5 ≤ pH ≤ 9,5	50 mM
Cäsiumchlorid	4 M

Material und Methoden

2.1.6.4.2 Chromosomale DNA aus *Nab. magadii*

Puffer B ₁		Cäsiumchloridlösung	
Natriumchlorid	4 M	1 g CsCl pro ml ddH ₂ O	
Tris-HCl pH 9,5	50 mM		
14 mM Desoxycholat		Phenol:Chloroform (1:1)	

2.1.6.4.3 BgaH-Aktivitätsmessung

bgaH-Puffer		ONPG-Lösung	
Natriumchlorid	2,5 M	ONPG	8 mg/ml
Tris-HCl pH 7,2	50 mM	Gelöst in bgaH-Puffer	
Manganchlorid	10 µM	Lagerung bei -20 °C	
β-Mercapto-Ethanol	0,1 %		
(Zugabe vor Verwendung)			
Lagerung bei 4 °C ohne β-Mercapto-Ethanol			
2 % Triton X-100			

2.1.7 Antikörper

Name	Gerichtet gegen...	Spezies	Quelle
α-rabbit (HRP)	FC-Teil der IgE aus Hasen; gekoppelt mit Horseradish-peroxidase (HRP)	Esel	GE Healthcare Cat. NA934V
α-φCh1	Hüllenproteine φCh1	Hase	Klein <i>et al.</i> , 2000
α-NEP	NEP aus <i>Nab. magadii</i>	Hase	Diese Arbeit
α-mtase	Methyltransferase aus <i>Nab. magadii</i>	Hase	Baranyi <i>et al.</i> , 2000
α-E	Protein E (ORF11) aus φCh1	Hase	Greineder, s. a.
α-ORF34	ORF34 aus φCh1	Hase	Till, 2011

Die Antikörper wurden in 1x TBS mit 0,3 % Bovines Serum Albumin (BSA) verwendet. Die jeweilige Verdünnung wird bei den Ergebnissen angegeben.

Material und Methoden

2.1.8 DNA- und Proteinmarker

2.1.8.1 DNA-Marker

Bezeichnung	Fragmente	Quelle/Bemerkungen
λ -BstEII	8454, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702 bp	λ -DNA wurde von Fermentas bezogen. Die Konzentration der DNA im fertigen Marker betrug 50 ng/ μ l. Cos-Fragmente wurden bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert.
pUC19:HaeIII	587, 458, 434, 298, 257, 174, 102, 80, 18, 11 bp	Die Konzentration der DNA im fertigen Marker betrug 50 ng/ μ l. Cos-Fragmente wurden bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert.
pUC19:HpaII	501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34 bp	Die Konzentration der DNA im fertigen Marker betrug 50 ng/ μ l. Cos-Fragmente wurden bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert.
pUC19:Sau3aI	955, 585, 341, 258, 141, 105, 78/75, 46, 36, 18/17, 12/11, 8 bp	Die Konzentration der DNA im fertigen Marker betrug 50 ng/ μ l. Cos-Fragmente wurden bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert.
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp	Fermentas; #SM0311
Biotinylated 2-Log DNA Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000 , 2000, 1500, 1200, 1000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bp	New England BioLabs #N7554S

Material und Methoden

2.1.8.2 Proteinmarker

Bezeichnung	Banden	Quelle
Unstained Protein	116, 66,2, 45, 35, 25,	Fermentas; #SM0431
Molecular Weight Marker	18,4, 14,4 kDa	

2.1.9. Enzyme und entsprechende Puffer

2.1.9.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas bezogen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Für Doppelverdau wurde der von Fermentas DoubleDigest™-Website (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>) empfohlene Puffer verwendet.

2.1.9.2 Enzyme für PCR

Polymerase	Quelle	Verwendung
<i>Pwo</i>	Peqlab	Klonierung, präparative PCR
<i>Pfu</i>	Promega	Klonierung, präparative PCR
GoTaq®	Promega	Analytische PCR

Alle Polymerasen wurden mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

2.1.9.3 Weitere Enzyme

Enzym	Quelle	Verwendung
T4-DNA-Ligase*	Fermentas/Promega	Klonierung
T4-DNA-Polymerase*	Fermentas	Erzeugung von blunt-ends
Klenow-Fragment*	Fermentas	Erzeugung von blunt-ends, Southern Blot
Proteinase K	Roche	Transformation <i>Nab. magadii</i>

*Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten oder in vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet.

Die erforderliche Konzentration der Proteinase K für die Transformation von *Nab. magadii* wurde zuvor experimentell bestimmt (Labor Angela Witte, unveröffentlicht).

2.2 Methoden

2.2.1 Probenahme und -vorbereitung

2.2.1.1 Probe BgaH-Aktivitätsmessung

x ml Kultur werden in einem Eppendorfgefäß für drei Minuten bei 16000g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vollständig in x/4 ml 2 M NaCl-Lösung resuspendiert. Die Probe wird bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Proteinprobe Zellrohextrakte

1,5 ml Kultur werden in einem Eppendorfgefäß für drei Minuten bei 16000g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vollständig in y µl 5 mM Natriumphosphatpuffer resuspendiert. y wird wie folgt berechnet:

$$y = OD_{600} \cdot 75$$

Dann werden y µl 2x Laemmlipobenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen ist die Probenvorbereitung abgeschlossen. Die Probe kann bei -20 °C gelagert werden. Vor Verwendung wird erneut für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt.

2.2.1.3 Proteinprobe TCA-Fällung

1,5 ml Kultur werden in einem Eppendorfgefäß für drei Minuten bei 16000g abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein 2-ml-Eppendorfgefäß überführt und auf Eis mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 5 %) eine Stunde lang inkubiert. Es wird für 30 Minuten bei 4 °C und 25000g abzentrifugiert. Das Pellet wird vollständig in y µl 5 mM Natriumphosphatpuffer resuspendiert. y wird wie folgt berechnet:

$$y = OD_{600} \cdot 75$$

Dann werden y µl 2x Laemmlipobenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen ist die Probenvorbereitung abgeschlossen. Die Probe kann bei -20 °C gelagert werden. Vor Verwendung wird erneut für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt.

Material und Methoden

2.2.1.4 Proteinprobe aufgereinigtes Protein

Die in Abschnitt 2.2.5.1 beschriebenen, aus den eluierten Fraktionen gezogenen Proben von 15 µl werden mit dem gleichen Volumen 2x-Laemmliprobenpuffer vermischt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen ist die Probenvorbereitung abgeschlossen. Die Probe kann bei -20 °C gelagert werden. Vor Verwendung wird erneut für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt.

2.2.1.5 Probenvorbereitung Phagentiter

Die Proben aus einer Wachstumskurve erhält man, indem 1,5 ml Kultur entnommen und bei 16000g für drei Minuten abzentrifugiert werden. Es wird 1 ml des Überstandes abgenommen, in ein neues Gefäß transferiert und mit 10 µl Chloroform versetzt. Dabei ist darauf zu achten, das entstandene Zellpellet nicht zu berühren oder aufzuwirbeln.

2.2.2 Methoden *Archaea*

2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen - *Nab. magadii*

Es wird eine frische Kultur *Nab. magadii* in 100 ml NVM+ mit 70 µg/ml Bacitracin angeimpft. Sobald die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,5 und 0,6 beträgt, werden die Zellen durch Abzentrifugieren (Raumtemperatur, 15 Minuten, 6000g) geerntet. Das Pellet wird in 50 ml Buffered High Salt Spheroblasting Solution mit Glycerol aufgenommen und nach Zugabe von 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 42 °C und 150 rpm inkubiert bis unter dem Mikroskop Spheroblasten zu sehen sind.

2.2.2.2 Transformation

Für die Transformation werden 1,5 ml kompetenter Zellen (hergestellt wie in 2.2.2.1 beschrieben) bei 9300g für 3 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in 150 µl „Buffered High Salt Spheroblasting Solution“ ohne Glycerol resuspendiert, mit 15 µl 0,5 M EDTA versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Es werden maximal 10 µl zu transformierender DNA zugefügt und für 5 Minuten inkubiert. Die verwendete DNA muss eine Konzentration von mindestens 500 ng/µl

Material und Methoden

aufweisen. Die Zellsuspension wird mit 150 µl 60 % PEG 600 (Unbuffered High Salt Spheroblasting Solution) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml NVM⁺ werden die Zellen für 5 Minuten bei 9300g abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml NVM⁺ aufgenommen. Die Zellen werden bei 37 °C und etwa 750 rpm regeneriert, bis unter dem Mikroskop Stäbchen zu erkennen sind, längstens jedoch zwei Tage.

Anschließend werden die Zellen auf NVM⁺-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Je Platte werden 100 µl verwendet, weiters für mindestens eine Platte 100 µl einer 1:10-Verdünnung der Zellen mit NVM⁺.

Für jede Transformation wird zusätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt. Diese wird ebenso wie die zu transformierenden Zellen behandelt, statt DNA-Lösung wird eine äquivalente Menge Wasser zugesetzt. Die Zellen werden auf je einer Platte mit und ohne entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Nach dem Ausplattieren werden die Platten für ein bis sechs Wochen bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle der Transformanden erfolgt wie in 2.2.2.4 beschrieben.

Sofern nicht anders angegeben erfolgen alle Schritte bei Raumtemperatur.

2.2.2.3 Transformation mit Minimalmedium

Die Transformation mit Minimalmedium wird analog der Transformation mit Vollmedium durchgeführt. Man lässt die Zellen in NVM⁺ regenerieren. Das Ausplattieren erfolgt auf NMMb⁺-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum, wobei dessen Konzentration im Vergleich zum Vollmedium auf die Hälfte reduziert wird.

Je Platte werden 100 µl verwendet, weiters für mindestens eine Platte je 100 µl der folgenden Verdünnungen in NMMb⁺: 1:10; 1:50; 1:100. Nach dem Ausplattieren werden die Platten für ein bis sechs Wochen bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle der Transformanden erfolgt wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben.

Material und Methoden

2.2.2.4 Kontrolle der Transformanden

Eine Woche nach der Transformation (siehe Abschnitt 2.2.2.2 bzw. 2.2.2.3.) werden die Agarplatten, die bei 37 °C inkubiert wurden, erstmals auf Kolonien überprüft. Sind Einzelkolonien sichtbar, werden diese als Vorkultur angesetzt. Dafür wird 1 ml Medium mit entsprechendem Antibiotikum in ein Eppendorfgefäß pipettiert, die Kolonie mittels einer Impföse in das Medium überführt und das Eppendorfgefäß schüttelnd bei 42 °C inkubiert. Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs der Kultur werden die Vorkulturen einmal täglich für fünf Minuten offen zu einer Flamme gestellt. Die Vorkulturen werden alle zwei Tage auf Wachstum überprüft, indem bei 9300g und Raumtemperatur für eine Minute abzentrifugiert wird.

Ist ein Pellet zu erkennen, ist die Vorkultur angewachsen und kann – nachdem ein Template hergestellt wurde (siehe Abschnitt 2.2.2.5) – mittels PCR auf den Erfolg der Transformation überprüft werden.

2.2.2.5 Herstellen eines Templates aus *Nab. magadii*

20 µl einer Kultur *Nab. magadii* werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei 16000g und Raumtemperatur für drei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Pellet in 100 µl ddH₂O gelöst.

2.2.2.6 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Nab. magadii*

Man lässt eine Kultur *Nab. magadii* in NVM⁺ bis zu einer OD₆₀₀ ≥ 0,6 anwachsen und zentrifugiert 200 ml Kultur bei Raumtemperatur und 11300g für 20 Minuten. Das Pellet wird in 5 ml Puffer B₁ gelöst und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt. Es werden 5 ml 14 mM Desoxycholat und anschließend 15 ml ddH₂O zugegeben. Nach jeder Zugabe wird das Röhrchen solange vorsichtig geschwenkt, bis die Flüssigkeiten vollständig gemischt sind. Danach überführt man die Lösung in zwei SS34-Zentrifugenröhrchen, gibt jeweils 12,5 ml Phenol/Chloroform (1:1) hinzu, invertiert mehrmals und zentrifugiert bei 4 °C und 11900g für 30 Minuten. Die wässrige Phase wird in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben transferiert und mit 0,6-fachem Volumen Isopropanol überschichtet. Die Spitze einer Pasteurpipette wird zugeschmolzen, anschließend wird die Pipette an der Bunsenbrennerflamme zu einem

Material und Methoden

schmalen Haken gebogen. Nach dem Abkühlen fährt man mit der Pasteurpipette mehrmals durch die überschichtete Lösung, wobei die ausgefallene DNA an der Pipette hängenbleibt und anschließend in ein Röhrchen mit 5 ml ddH₂O überführt wird. Sobald sich die DNA vollständig gelöst hat, gibt man 1,5 g CsCl pro ml DNA-Lösung hinzu. Dann wird die Lösung mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt, in Quick-Seal-Röhrchen (Seton: cone top centrifuge tubes) eingeschweißt und bei 20 °C und 60 krpm in der Ultrazentrifuge vom Typ Bechmann OptimaTM TLX (Rotor: TL-100.4) für mindestens 16 Stunden zentrifugiert.

Es zeigen sich zwei Banden, von denen sich die untere am Boden des Röhrchens befindet und die ebenfalls isolierte RNA darstellt. Bei der oberen Bande handelt es sich um die isolierte chromosomale DNA. Diese wird in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Entfernung des Ethidiumbromids mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt, bis die Lösung farblos ist. Die DNA wird über Nacht gegen ddH₂O dialysiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.7 BgaH-Aktivitätsmessung

700 µl des bgaH-Puffers werden in einer Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von entweder 100 µl Kultur oder 25 µl Probe (Vorbereitung wie in 2.2.1.1 beschrieben) wird kurz gevortext. Anschließend wird 100 µl 2 % Triton X-100 in ddH₂O zugegeben, erneut gevortext und nach kurzer Wartezeit die Reaktion durch Zugabe von 100 µl ONPG (8 mg/ml) gestartet. Erneutes Vortexen stellt die Homogenität der Reaktionslösung sicher.

Die Aktivität des Enzyms wird durch den Verlauf der Absorption bei 405 nm verfolgt. Die Absorption wird mit einem Fotometer über einen Zeitraum von zwei Minuten im Abstand von jeweils 20 Sekunden gemessen. Bei geringer Aktivität kann die Absorption alternativ alle 5 bis 10 Minuten über einen Zeitraum von bis zu einer Stunde gemessen werden. Da das Substrat ONPG im Überschuss vorliegt, ist die Zunahme der Absorption durch die Bildung von o-Nitrophenol über längere Zeit linear. Die Länge dieser Zeitspanne hängt ab von der Stärke des untersuchten Promotors sowie von der eingesetzten Menge an Probe/Kultur.

Als Blindprobe dient die Mischung aus 800 µl bgaH-Puffer und jeweils 100 µl 2 % Triton X-100 und ONPG (8 mg/ml). Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wird die OD₆₀₀ der Kultur gemessen.

Material und Methoden

2.2.2.8 Proteingehalt einer Proteinprobe aus *Nab. magadii*

In einer Küvette wird 1 ml verdünnte Bradfordlösung (BioRad, Kat.Nr. 500-0006) vorgelegt. 25 µl Probe (Probenvorbereitung wie in 2.2.1.1 beschrieben) werden zunächst in einem separaten Gefäß mit 75 µl ddH₂O verdünnt und dann der Bradfordlösung zugefügt. Man vortext für zehn Sekunden und lässt die Lösung für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgt unter Heranziehung einer Kalibriergeraden, welche durch Messung von BSA-Standards mit bekannten Konzentrationen zwischen 0,2 und 1,4 mg/ml erstellt wird.

2.2.3 Methoden für Phagen

2.2.3.1 Phagenisolation aus *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11-ΔORF79

5 l NVM⁺ werden mit *Nab. magadii* L11 bzw. *Nab. magadii* L11-ΔORF79 bei einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die OD₆₀₀ wird täglich gemessen und eine Wachstumskurve angefertigt. Am Ende der Lyse – erkennbar durch das Abflachen der Abnahme der OD₆₀₀ – wird die Kultur abzentrifugiert (Raumtemperatur, 15 Minuten, 6000g). Die Überstände werden gesammelt und mit 10 % (w/V) PEG 6000 sanft über Nacht gerührt. Die am PEG 6000 adsorbierten Phagen werden durch Zentrifugieren (Raumtemperatur, 30 Minuten, 8300g) geerntet. Das Pellet wird in 30 ml Puffer B₁ resuspendiert und in weiterer Folge durch Ultrazentrifugation gereinigt.

Es wird ein Stufengradient wie folgt aufgebaut: 2 ml Lösung 1.5, 4 ml Lösung 1.3, 5 ml Phagensuspension. Lösung 1.1 wird verwendet, um die Zentrifugenröhrchen aufzufüllen und auszutarieren. Die Ultrazentrifugation wird mit dem Ausschwingrotor SW40 in einer Beckmann Optima™ L-70 Ultrazentrifuge bei 20 °C und 30 krpm für 20 Stunden durchgeführt. Die Phagen sind als bläulich-trübe Bande an der Grenze zwischen den Lösungen 1.3 und 1.5 erkennbar, werden abgenommen und in einem Falcon-Röhrchen vereinigt.

Material und Methoden

In passenden Zentrifugenröhrchen wird die Phagensuspension mit dem gleichen Volumen an Lösung 1.3 gemischt und erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Phagen-Bande wird möglichst exakt abgenommen und in einem Falcon-Röhrchen vereinigt.

Die Phagensuspension wird 2x gegen Puffer B₁ dialysiert. Anschließend wird der Erfolg der Phagenisolation mittels Phagentiter überprüft (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.2 Phagentiter

Aus der zu untersuchenden Phagensuspension bzw. Probe (siehe 2.2.1.5) wird durch Verdünnen mit NVM⁺ die folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 1:10², 1:10⁴, 1:10⁶, 1:10⁸. Zu 5 ml flüssigem NVM⁺-Softagar werden jeweils 100 µl einer Phagenverdünnung sowie 400 µl einer *Nab.-magadii*-Kultur zugegeben, welche sich in der späten exponentiellen Wachstumsphase befindet. Die gut durchmischte Lösung wird auf eine NVM⁺-Agarplatte geleert, man lässt über Nacht auf Raumtemperatur antrocknen. Nach Inkubation für etwa ein bis zwei Wochen bei 37 °C sind Plaques sichtbar. Diese werden gezählt, woraus die „plaque-forming-units“ (pfu) pro Milliliter in der ursprünglichen Suspension/Probe berechnet werden können.

2.2.4 Methoden *E. coli*

2.2.4.1 Herstellen hitzeschock-kompetenter Zellen

E. coli XL1-Blue wird in 100 ml LB (plus Tetracyclin) mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis die OD₆₀₀ 0,6 beträgt. Es wird zentrifugiert (10 Minuten, 16250g, 4 °C), das Pellet in 40 ml MOPS I resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Erneut wird zentrifugiert (10 Minuten, 16250g, 4 °C), das Pellet in 40 ml MOPS II resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 Minuten, 16250g, 4 °C) wird das Pellet in 2 ml MOPS IIa aufgenommen und zu je 100 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Aliquote werden bei -80 °C aufbewahrt.

Material und Methoden

2.2.4.2 Transformation durch Hitzeschock

Ein Aliquot kompetenter Zellen (siehe 2.2.4.1) wird auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 15 µl DNA (Ligationsansatz) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Eppendorfgefäß wird für 2 Minuten in einen Heizblock gestellt, welcher auf 42 °C vorgewärmt wurde, und anschließend sofort für 3 Minuten auf Eis abgekühlt. Es werden 300 µl LB ohne Antibiotikum zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach werden je 120 µl Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit für die Selektion passendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.3 Kontrolle und Bestätigung der Transformanden

Die durch Transformation erhaltenen Kolonien (siehe 2.2.4.2) werden in 5-ml-LB-Eprouvetten mit entsprechenden Antibiotika als Übernacht-Kultur angesetzt. 300 µl dieser Kultur werden zentrifugiert (3 Minuten, 16000g, Raumtemperatur), der Überstand wird verworfen und das Pellet in 30 µl 5x DNA-Auftragspuffer resuspendiert. Es werden 14 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt, 15 Sekunden gevortext und abzentrifugiert (3 Minuten, 16000g, Raumtemperatur). 12 µl des Überstands werden auf ein Agarosegel geladen und die DNA aufgetrennt.

Das Gel wird im Ethidiumbromidbad gefärbt, bis unter UV-Bestrahlung Banden sichtbar sind. Anhand des Ergebnisses werden ein bis drei Klone für die weitere Analyse ausgewählt. Es werden jene Klone gewählt, deren enthaltene Plasmide im Vergleich zu den anderen Banden höher erscheinen, da das Plasmid bei erfolgreicher Ligation mit einem Insert schwerer wird und somit langsamer läuft.

Aus den gewählten Klonen wird Plasmid isoliert. Die Bestätigung erfolgt entweder durch eine analytische PCR mit spezifischen Primern oder einen Restriktionsverdau, bei dem das Insert testweise wieder herausgeschnitten wird. Sobald die Bestätigung vorliegt, wird eine frische Übernacht-Kultur angeimpft. 1 ml dieser Kultur wird mit 800 µl 50 % Glycerol (autoklaviert) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Material und Methoden

2.2.5 Methoden Proteine

2.2.5.1 Expression und denaturierende Aufreinigung eines Proteins mit His-Tag

Um ein Protein zu exprimieren und aufzureinigen, wird zunächst ein Plasmid in *E. coli* transformiert, welches das entsprechende Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors enthält. Wurde eine Einzelkolonie positiv für das betreffende Plasmid getestet, wird sie zunächst als Vorkultur angesetzt. Dafür impft man die Kolonie in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika an und lässt sie über Nacht wachsen.

Für die Expression des Proteins wird einer größeren Menge LB soviel Vorkultur hinzugefügt, dass diese eine OD₆₀₀ von 0,1 aufweist. Diese Kultur lässt man bei 37 °C wachsen, bis die OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,4 liegt und induziert die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Nach vier Stunden werden die Zellen durch Abzentrifugieren für 15 Minuten bei 6000g und 4 °C geerntet. Die Pellets werden über Nacht bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen in Puffer B gelöst. Es sind 30 ml Puffer B pro Liter Kultur zu verwenden. Die entstehende Suspension lässt man über Nacht rühren, um Homogenität zu gewährleisten, anschließend werden die Zellen durch Sonifizieren (3x 4 Minuten, Power 90 %, Cycle 72) aufgebrochen und die im Überstand befindlichen Proteine von verbleibenden Zellresten durch Zentrifugieren (9700g, 4 °C, 20 Minuten) getrennt. Das Pellet wird verworfen, zum Überstand gibt man 150 µl Nickel-Nitriloessigsäuresuspension (Ni-NTA) je verarbeitetem Liter Kultur, mindestens jedoch 500 µl, und rührt vorsichtig über Nacht.

Die Suspension wird durch eine Chromatographiesäule mit Glasfritte filtriert. Die entstehende Säule wird zweimal mit 4 ml Puffer C gewaschen. Die gebundenen Proteine werden mit mindestens 6 x 0,5 ml Puffer E eluiert, wobei auf eine möglichst geringe Durchflussgeschwindigkeit zu achten ist. Von jeder Fraktion wird eine Probe von 15µl entnommen und gemäß Abschnitt 2.2.1.4 vorbereitet. Danach erfolgt die Auftrennung durch SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.5.2) und Analyse des mit Coomassie gefärbten Gels.

Auswahlkriterien sind die Reinheit der Fraktion sowie die Konzentration des gewünschten Proteins. Die ausgewählten Fraktionen werden vereinigt und gegen 1x PBS dialysiert.

Material und Methoden

2.2.5.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Apparatur von Bio-Rad (Mini-Protean®) für Polyacrylamidgele (PAA-Gele) mit einer Dicke von 0,75 mm entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Nach dem Aufbau der Apparatur werden die Lösungen für das Trenngel (siehe Liste unterhalb) in einem Becherglas gründlich gemischt, zügig zwischen die Glasplatten pipettiert und mit 2-Propanol überschichtet. Das Trenngel sollte eine Höhe von etwa 6 cm haben und genug Platz für das Sammelgel lassen. Nach dem Aushärten wird das 2-Propanol abgeleert, die Reagenzien für das Sammelgel (siehe Liste unterhalb) werden in einem Becherglas vermengt und auf das Trenngel pipettiert, sodass die Kammer gefüllt ist. Direkt anschließend wird der Kamm platziert.

Nach dem Polymerisieren wird das Gel in einer Laufkammer mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer überschichtet und der Kamm gezogen. Von den Proben (wie in den Abschnitten 2.2.1.2 bis 2.2.1.4 vorbereitet) werden 10 µl geladen, vom Marker 7,5 µl. Es wird eine Spannung von 40 V angelegt bis das Bromphenolblau durch das Gel gewandert ist und ausläuft.

Anschließend wird die Apparatur auseinandergebaut, das Sammelgel nach Abtrennung verworfen und das Trenngel für mehrere Minuten mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, bis das Gel blau erscheint. Danach wird das gefärbte Gel so lange in Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund hinreichend entfärbt ist und die Banden sichtbar sind.

12 % Trenngel

ddH ₂ O	1,75 ml
4x Trenngelpuffer	1,25 ml
30 % AA-Lösung (29:1)	2 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	10 µl

4 % Sammelgel

ddH ₂ O	1,233 ml
4x Sammelgelpuffer	500 µl
30 % AA-Lösung (29:1)	267 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	5 µl

2.2.5.3 Western Blot

Es wird eine SDS-PAGE wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Nach dem Abtrennen des Sammelgels wird das Trenngel für den Aufbau des Blots – beschrieben im Abschnitt 2.2.5.3.1 – verwendet.

Material und Methoden

2.2.5.3.1 Blotten

Für das Blotten des Gels nach der Semi-dry-Methode werden benötigt: sechs Stück Whatman-Filterpapiere sowie eine Nitrocellulosemembran (Whatman: Protran®), alle in Größe des Trenngels zugeschnitten. Es wird ein Blotter der Marke Bio-Rad (Transblot-SD, Semi-dry transfer cell) verwendet.

Drei Stück Filterpapier werden mit Transblotpuffer befeuchtet und auf den geöffneten Blotter gelegt. Darauf platziert man zuerst die Nitrocellulosemembran und das Trenngel. Anschließend werden die verbleibenden Filterpapiere mit Transblotpuffer befeuchtet und auf das Trenngel gelegt. Beim Aufbau des Blots ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Dann schließt man die Apparatur und legt für 20 Minuten eine Spannung von 20 V an.

Nach Ablauf der Zeit wird der Blot abgebaut, die Membran kurz mit Ponceau-S überschichtet und der Hintergrund mit Wasser soweit entfärbt, dass die geblotteten Proteine gut zu erkennen sind. Die Banden des Proteinmarkers werden mit Bleistift gekennzeichnet, die Membran mit Wasser entfärbt, mit Blockierungslösung überschichtet und über Nacht bei 4 °C geschwenkt.

2.2.5.3.2 Detektion mittels Antikörper

Die Blockierungslösung wird abgeleert und die Membran 3x für 10 Minuten mit 100 ml 1x TBS gewaschen. Dann wird der primäre Antikörper – gerichtet gegen das zu detektierende Protein – in 10 ml 1x TBS entsprechend verdünnt, auf die Membran aufgebracht und unter Schwenken eine Stunde inkubiert. Die Antikörperlösung wird abgeleert und die Membran wieder 3x für 10 Minuten mit 100 ml 1x TBS gewaschen. Danach wird der sekundäre Antikörper α -rabbit (HRP) mit der Verdünnung 1:5000 in 10 ml 1x TBS auf die Membran aufgebracht und unter Schwenken eine Stunde inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (5 Minuten, 100 ml 1x TBS) der Membran wird mit dem Kit „Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ der Firma Thermo Scientific nach den beigelegten Angaben entwickelt.

Die Membran wird in eine Filmkassette gelegt, sodass Fotofilme in einer Dunkelkammer belichtet und entwickelt werden können. Die Belichtungszeit wird für jeden Blot individuell so angepasst, dass die Signale auf den Filmen deutlich sichtbar sind. Es werden „Amersham Hyperfilm™ ECL“ der Firma GE Healthcare verwendet.

Material und Methoden

2.2.6 DNA-Methoden

2.2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele werden durch Schmelzen von Agarose in 1x TAE hergestellt. Dafür wird die Suspension in der Mikrowelle bis zum vollständigen Aufschmelzen erhitzt. Nach dem Abkühlen auf unter 50 °C wird das Gel in einer passenden Apparatur gegossen.

Der Prozentsatz der Agarose wird der Größe der Fragmente und dem gewünschten Auftrennungsgrad angepasst. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um 0,8 % Agarosegele.

2.2.6.2 PAA-Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 1000 Basenpaaren oder weniger wird ein 6-%iges PAA-Gel verwendet. Die Apparatur von Bio-Rad (Mini-Protean®) wird aufgebaut, die Reagenzien werden wie unten angegeben gemischt und zügig zwischen die Glasplatten pipettiert. Dann plaziert man den Kamm und lässt das Gel polymerisieren. Das fertige Gel wird in die zugehörige Apparatur eingebaut und die Probe für 26 Minuten bei 20 mA pro Gel aufgetrennt.

6 % PAA-Gel	
1x TBE	
30 % AA-Lösung (29:1)	1,2 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl

2.2.6.3 Darstellung der DNA

Sowohl Agarose- als auch 6-%-PAA-Gele werden zur Darstellung der DNA für bis zu 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) gefärbt und danach kurz in ddH₂O entfärbt. Anschließend wird die DNA unter UV-Strahlung dargestellt.

Material und Methoden

2.2.6.4 Gelelution aus Agarosegel

Für die Gelelution wird die aufzureinigende DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, wobei der Prozentsatz des Gels und die Laufbedingungen passend für das gewünschte Fragment gewählt werden. Sobald das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt ist, kann auf einem UV-Tisch das gewünschte Fragment aufgrund seiner Größe identifiziert und die Bande ausgeschnitten werden. Das Agarosegelstück wird in ein Eppendorfgefäß transferiert und die Aufreinigung mit dem „QIAquick gel extraction kit“ (Qiagen) laut beigelegtem Protokoll durchgeführt. Die DNA wird abhängig von der zuvor am Gel abgeschätzten Konzentration mit 30 bis 50 µl ddH₂O eluiert, sodass möglichst keine unnötige Verdünnung entsteht.

2.2.6.5 Gelelution aus PAA-Gel

Für die Gelelution wird die aufzureinigende DNA in einem 6%-PAA-Gel aufgetrennt. Sobald das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt ist, kann auf einem UV-Tisch das gewünschte Fragment aufgrund seiner Größe identifiziert und die Bande ausgeschnitten werden. Das Gelstück wird in ein Eppendorfgefäß transferiert, zerkleinert und mit 300 µl Elutionspuffer (QIAquick PCR purification kit von Qiagen) versetzt. Die Mischung wird schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wird für 5 Minuten bei 16000g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die weitere Aufreinigung mit dem „QIAquick PCR purification kit“ (Qiagen) laut beigelegtem Protokoll durchgeführt. Die DNA wird abhängig von der zuvor am Gel abgeschätzten Konzentration mit 30 bis 50 µl ddH₂O eluiert, sodass möglichst keine unnötige Verdünnung entsteht.

Material und Methoden

2.2.6.6 PCR

Es wird die analytische und die präparative PCR beschrieben.

2.2.6.6.1 Template-DNA

Als Template wurden eingesetzt:

DNA	Verdünnung
Genomische DNA <i>Nab. magadii</i>	1:30 bis 1:50
Genomische DNA ϕ Ch1	1:30
Template <i>Nab. magadii</i> -Kultur	unverdünnt
Plasmid aus Mini Prep.	1:30

2.2.6.6.2 Primer

Die Primer wurden von VBC bezogen und waren lyophilisiert. Sie wurden in der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verwendet und dafür in ddH₂O gelöst und verdünnt. Die Schmelztemperatur wurde mit dem Programm „Gene Runner“ aus der Sequenz errechnet.

2.2.6.6.3 PCR-Ansatz und Programm

Für Klonierung bzw. präparative PCR wurde *Pwo*- (Peqlab) oder *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, da diese Proofreading-Aktivität besitzen. Für analytische PCR wurde GoTaq® DNAPolymerase (Promega) eingesetzt.

Analytische PCR		Präparative PCR	
ddH ₂ O	Ad 50 μl	ddH ₂ O	Ad 100 μl
5x GoTaq® Puffer	10 μl	10x Puffer	10 μl
2 mM dNTPs	5 μl	2 mM dNTPs	10 μl
Primer forward	2,5 μl	Primer forward	5 μl
Primer reverse	2,5 μl	Primer reverse	5 μl
GoTaq® DNAPolymerase	0,5 μl	DNAPolymerase	2 μl
Template	1 μl	Template	1 μl

Material und Methoden

PCR-Programm für analytische PCR

Denaturierung 95 °C	Annealing Spezifisch*	Elongation 72 °C	Anzahl Zyklen
5 min	1 min	1 min /kb	1x
1 min	1 min	1 min /kb	33 x
1 min	1 min	5-10 min	1x

PCR-Programm für präparative PCR

Denaturierung 95 °C	Annealing Spezifisch*	Elongation 72 °C (<i>Pfu</i>) / 68 °C (<i>Pwo</i>)	Anzahl Zyklen
5 min	1 min	2 min /kb	1x
1 min	1 min	2 min /kb	33 x
1 min	1 min	5-10 min	1x

*Die Annealingtemperatur wird den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer angepasst.

2.2.6.7 PCR-Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „QIAquick PCR purification kit“ (Qiagen) laut beigelegtem Protokoll. Die DNA wurde abhängig von der zuvor am Gel abgeschätzten Konzentration mit 30 bis 50 µl ddH₂O eluiert, sodass möglichst keine unnötige Verdünnung entsteht.

2.2.6.8 Plasmidisolation aus *E. coli*

E. coli-Kultur (2x 1,5 ml) wurden für 3 Minuten bei 16000g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zur Isolation von Plasmid-DNA verwendet. Dafür wurde das GeneJET™ plasmid miniprep kit (Fermentas) laut Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde abhängig von der zuvor am Gel abgeschätzten Konzentration mit 30 bis 50 µl ddH₂O eluiert, sodass möglichst keine unnötige Verdünnung entsteht.

2.2.6.9 Restriktion

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas bezogen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Für Doppelverdaue wurde der von Fermentas DoubleDigest™-Website (Fermentas, 2011) empfohlene Puffer verwendet.

Material und Methoden

Erfolgte der Restriktionsansatz für eine Klonierung, wurde die empfohlene Inkubationsdauer von 3 Stunden bis über Nacht strikt eingehalten und der Erfolg der Restriktion mittels Gelelektrophorese überprüft. Einzige Ausnahme bildeten hierbei PCR-Produkte, da bei diesen kein Unterschied zwischen dem restringierten und dem nicht restringierten Fragment zu erkennen wäre.

Erfolgte der Restriktionsansatz, um das Ergebnis einer Klonierung zu überprüfen – also aus analytischen Gründen –, wurde die Inkubationszeit auf etwa eine Stunde verkürzt. In diesen Fällen wurde der gesamte Restriktionsansatz zur Analyse mittels Gelelektrophorese eingesetzt.

2.2.6.10 Klenow-Fragment

Das zuvor restringierte DNA-Fragment wird wie unten angegeben angesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die eingesetzte Menge an DNA wird der jeweiligen Konzentration angepasst. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Klenow-Fragments durch Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten.

Ansatz für Klenow-Fragment	
ddH ₂ O	Ad 20 µl
DNA-Fragment	10-17 µl
10x Tango Puffer	2 µl
2 mM dNTPs	1 µl

2.2.6.11 Ligation

Der Ligationsansatz wird wie unten angegeben zusammenpipettiert und entweder für drei Stunden auf Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Transformation in *E. coli*.

Ligationsansatz	
Insert	11,5 µl
Ligations-Puffer	1,5 µl
Vektor	1 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl

2.2.6.12 Southern Blot

Im Zuge der Vorbereitung wird die Sonde für den Southern Blot mit dem NEBlot® Phototope® Kit der Firma New England BioLabs markiert. Dafür muss ein zur Fragestellung passendes DNA-

Material und Methoden

Fragment isoliert werden und in Wasser gelöst vorliegen. Man legt 34 µl DNA-Lösung in einem Eppendorfgefäß vor, denaturiert für 10 Minuten bei 95 °C und inkubiert anschließend sofort für 5 Minuten auf Eis. Dann vervollständigt man den Ansatz für die Markierung durch Zugabe von 10 µl 5x labelling mix, 5 µl dNTP mix (biotinyliert) und 1 µl Klenow-Fragment und inkubiert bei 37 °C. Nach drei Stunden wird die Reaktion durch Zugabe 0,5 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und die DNA gefällt. Dies geschieht durch Zugabe von 10 µl 4 M Lithiumchlorid und 150 µl 96 % Ethanol und Inkubation für 20 Minuten bei -20 °C. Es wird bei 4 °C und 25000g für 30 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet ist, wird es in 20 µl ddH₂O gelöst.

Für den Blot wird die zu untersuchende DNA mit 1 µl Marker „Biotinylated 2-Log DNA Ladder“ aus dem NEBlot® Phototope® Kit auf ein 1,2 % Agarosegel geladen und langsam aufgetrennt. Dann wird das Gel für je 30 Minuten zuerst in 0,4 M NaOH/0,6 M NaCl und anschließend in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) geschwenkt und für den Bau des Kapillarblots verwendet. Hierfür schneidet man ein Stück „Amersham Hybond™“-Membran (GE Healthcare) in der Größe des Gels zu, wäscht diese in 10x SSC und baut den Blot auf wie folgt: In der Mitte einer Wanne wird durch ein anderes Gefäß eine Plattform gebildet, auf der der Blot aufgebaut wird. In die Wanne gibt man 1-1,5 Liter 10x SSC. Man legt nun drei mit 10x SSC befeuchtete Whatman-Filterpapiere so über die Plattform, dass sie auf beiden Seiten in 10x SSC tauchen und auf dem Grund der Wanne aufliegen. Darauf werden in dieser Reihenfolge das vorbereitete Gel, die gewaschene Hybond™-Membran, drei mit 10x SSC befeuchtete Whatman-Filterpapiere in Größe des Gels und ausreichend saugfähige Tücher sowie ein Gewicht zum Beschweren gelegt. Das Blotten erfolgt über Nacht und wird anderentags überprüft, indem das Gel nach Färben im Ethidiumbromidbad auf verbliebene DNA kontrolliert wird.

Nach Abbau des Blots wird die Membran für je eine Minute zuerst in 0,4 M NaOH und dann in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) gelegt und anschließend durch UV-Bestrahlung fixiert. Dies wird mit dem Stratalink cross-linker der Firma Stratagene nach deren Angaben durchgeführt.

Für die Hybridisierung wird die Membran in eine Hybridisierungsflasche transferiert und nach Zugabe von 12 ml Hybridisierungspuffer und 120 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) im

Material und Methoden

Hybridisierofen (rotierend, 65 °C) für mindestens drei Stunden inkubiert. Dann wird die markierte Sonde für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und zugefügt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht (rotierend, 65 °C).

Zum Entwickeln wird der „Phototope®-Star detection Kit“ der Firma New England BioLabs verwendet. Nach der Hybridisierung wird der Puffer abgeleert und die Membran in der Hybridisierungsflasche 2x mit 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 2x mit 0,1x SSC/0,1 % SDS bei 65 °C für 15 Minuten gewaschen. Nun wird die Membran in ein Schälchen passender Größe gelegt, 5 Minuten in Blocklösung geschwenkt und danach für 5 Minuten mit Streptavidinlösung, bestehend aus 7 ml Blocklösung mit 7 µl Streptavidin aus dem Kit, inkubiert. Es wird 3x für 5 Minuten mit Waschlösung I gewaschen, gefolgt von 5 Minuten Inkubation mit „biotinylated alkaline phosphatase-solution“. Diese beinhaltet 7 ml Blocklösung und 7 µl Alkaline Phosphatase aus dem Kit. Es wird für 5 Minuten mit Blockierungslösung, anschließend 3x 5 Minuten mit 1x Waschlösung II gewaschen. Man inkubiert die Membran für 5 Minuten mit CDP-Star™-Lösung (3 ml Verdünnungspuffer, CDP-Star™-Reagens) und nimmt danach die Flüssigkeit sorgfältig ab.

Die Membran wird in eine Filmkassette gelegt, sodass Fotofilme in einer Dunkelkammer belichtet und entwickelt werden können. Die Belichtungszeit wird für jeden Blot individuell so angepasst, dass die Signale auf den Filmen deutlich sichtbar sind. Es werden „Amersham Hyperfilm™ ECL“ der Firma GE Healthcare verwendet.

2.2.7 Klonierungsstrategien

2.2.7.1 pRo5-prom tna

Aus dem Plasmid pPRV1-ptna wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Hind*III und *Kpn*I ein Fragment ausgeschnitten, welches den tna-Promotor aus *Hfx. volcanii* enthält. Dieses wurde direkt in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pRo5 ligiert.

Material und Methoden

2.2.7.2 pRo5-tna-bgaH

Das Plasmid pPRV1-ptna wurde mit *Bam*HI geschnitten, der 5'-Überhang durch Klenow-Fragment mit dNTPs aufgefüllt und anschließend mit *Hind*III verdaut. Das entstandene Fragment enthält die *bgaH*-Region unter der Kontrolle des tna-Promotors aus *Hfx. volcanii*. Der Vektor pRo5 wurde zunächst mit *Kpn*I, dann mit T4 DNA Polymerase und dNTPs inkubiert, schließlich mit *Hind*III verdaut und mit dem Fragment ligiert.

2.2.7.3 pRo5-tnaN-bgaH

Der Promotor tnaN wurde durch eine präparative PCR mit den Primern Tna-N-1 und Tna-N-2 von einem *Nab. magadii* L13-Template amplifiziert. Nach einem Doppelverdau mit *Hind*III und *Bam*HI wurde das Fragment in pBAD24 (geschnitten mit denselben Enzymen) ligiert.

Das entstandene Plasmid pBAD24-tnaN wurde im Doppelverdau mit *Nde*I und *Bam*HI restringiert. Aus dem Plasmid pPRV1-ptna wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI die *bgaH*-Region ausgeschnitten und in pBAD24-tnaN kloniert, woraus das Plasmid pBAD24-tnaN-bgaH resultiert. Das nun fertige Konstrukt tnaN-bgaH wurde für die Klonierung in den Shuttle-Vektor pRo5 vorbereitet, indem mit *Bam*HI verdaut, der 5'-Überhang durch Klenow-Fragment mit dNTPs aufgefüllt und anschließend mit *Hind*III geschnitten wurde. Der Vektor pRo5 wurde zunächst mit *Kpn*I, dann mit T4 DNA Polymerase und dNTPs inkubiert, schließlich mit *Hind*III verdaut und mit dem Fragment tnaN-bgaH ligiert.

2.2.7.4 pRo5-tnaN-ORF93

Der Promotor tnaN wurde durch eine präparative PCR mit den Primern Tna-N-1 und Tna-N-2 von einem *Nab. magadii* L13-Template amplifiziert. Nach einem Doppelverdau mit *Hind*III und *Bam*HI wurde das Fragment in pBAD24 (geschnitten mit denselben Enzymen) ligiert.

Das entstandene Plasmid pBAD24-tnaN wurde im Doppelverdau mit *Nde*I und *Bam*HI restringiert und mit dem geschnittenen PCR-Produkt ORF93 ligiert. Der ORF93 des Phagen ϕ Ch1 wurde durch eine präparative PCR mit den Primern 93-3-Bgl und 93-5-Nde (Template: ϕ Ch1-DNA) amplifiziert und mit *Nde*I und *Bgl*II geschnitten. Vektor und PCR-Produkt können ligiert

Material und Methoden

werden, da die Überhänge der Schnittstellen *Bgl*II und *Bam*HI kompatibel sind. Beide Schnittstellen werden dabei zerstört.

Für die Klonierung in den Shuttle-Vektor pRo5 wird das Konstrukt tnaN-ORF93 mittels PCR mit den Primern Tna-N-1 und 93-3-Kpn amplifiziert und mit *Hind*III verdaut. Der Vektor pRo5 wird zunächst mit *Kpn*I, dann mit T4 DNA Polymerase und dNTPs inkubiert, schließlich mit *Hind*III verdaut und mit dem Fragment tnaN-ORF93 ligiert.

2.2.7.5 pNB102 -prom49-ORF79

Der ORF79 des Phagen ϕ Ch1 wurde durch eine präparative PCR mit den Primern 79-Bgl und 79-Pst von einem ϕ Ch1-DNA-Template amplifiziert und mit *Bgl*II und *Pst*I verdaut. Das Plasmid pUC19-prom49 wurde im Doppelverdau mit *Pst*I und *Bam*HI restringiert und mit dem geschnittenen PCR-Produkt ORF79 ligiert. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pUC19-prom49-ORF79. Vektor und PCR-Produkt können ligiert werden, da die Überhänge der Schnittstellen *Bgl*II und *Bam*HI kompatibel sind. Beide Schnittstellen werden dabei zerstört.

Der Vektor pUC19-prom49-ORF79 wird mit *Hind*III verdaut, der 5'-Überhang durch Klenow-Fragment mit dNTPs aufgefüllt und anschließend mit *Kpn*I geschnitten. Der Vektor pNB102 wurde zunächst mit *Xba*I, dann mit Klenow-Fragment und dNTPs inkubiert, schließlich mit *Kpn*I verdaut und mit dem Fragment prom49-ORF79 ligiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Deletionsmutanten von *Nab. magadii* L13 und ϕ Ch1

3.1.1 Deletionsmutanten von *Nab. magadii* L13

Für haloalkaliphile *Archaea*, zu denen *Nab. magadii* zählt, konnte bereits ein Transformationssystem etabliert werden (Iro *et al.*, in Vorbereitung). Mit dieser Technik als Grundlage war es in weiterer Folge möglich, zum ersten Mal eine Deletionsmutante von *Nab. magadii* zu konstruieren (Derntl, 2009). Hierzu wird ein Plasmid transformiert, welches das zu deletierende Gen unterbrochen von einer Resistenzkassette trägt, nicht aber einen Replikationsursprung für den Zielorganismus. Daher ist die einzige Möglichkeit, um die Resistenz für die Zelle nutzbar zu machen, die genomische Integration der Kassette durch homologe Rekombination.

Der Austausch des gewählten Gens durch seine disruptierte Version wird durch entsprechende PCRs nachgewiesen. Hierbei ist ein Primer so zu wählen, dass er außerhalb jener flankierenden Regionen bindet, die im Konstrukt auf dem Suicide-Vektor enthalten waren. Der andere Primer erkennt eine Sequenz innerhalb der eingebrachten Resistenz, da diese vorher nicht im Organismus enthalten war und somit spezifisch für die genetische Veränderung ist.

Ist der Austausch bestätigt, ist eine homozygote Mutante das Ziel. Da es sich bei *Nab. magadii* um einen polyploiden Organismus handelt, bedarf dies einigen Aufwands. Die genaue Anzahl der in den Zellen vorliegenden Genomkopien ist nicht bekannt, wird aber auf etwa 25 geschätzt.

Abbildung 7 zeigt ein Modell für die Entstehung einer homozygoten Mutante eines polyploiden Organismus. Bei jeder Zellteilung werden dabei die Chromosomen mit und ohne Mutation zufällig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Aus statistischen Gründen werden nach einer bestimmten Anzahl von Generationen auch Zellen vorliegen, welche homozygot für die Mutation sind. Die Anzahl der benötigten Generationen hängt von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen Genomkopien ab.

Ergebnisse und Diskussion

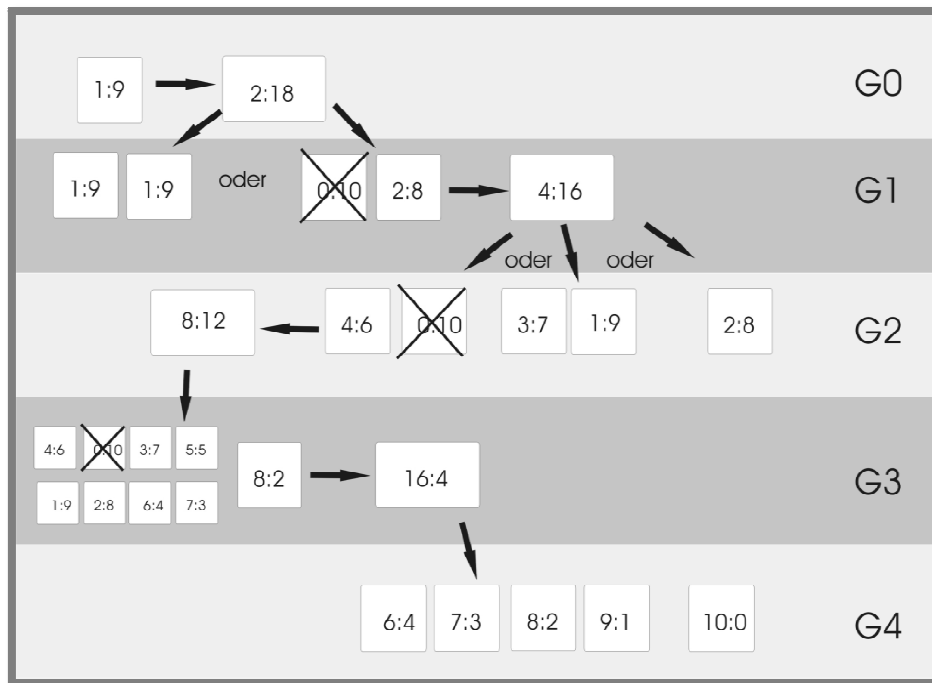


Abbildung 7: Verteilung der (mutanten) Chromosomen

Gezeigt wird ein Schema für die Entstehung einer homozygoten Mutante in einem polyploiden Organismus. Es wird angenommen, dass dieser Organismus jeweils 10 Kopien seines Genoms besitzt und dass in eine dieser Kopien eine Mutation mit Hilfe eines selektierbaren Markers eingebracht wurde. Die Verteilung der Genomkopien bei der Zellteilung wird anhand von ausgewählten Beispielen bis zum Auftreten eines Genotyps, der homozygot für die Mutation ist, verfolgt.

Grafik und Text erstellt nach Derntl, 2009

Um eine homozygote Mutante zu erhalten, wird die heterozygote Mutante passagiert. Das bedeutet, man lässt sie mehrmals in Medium mit einem der Resistenzkassette entsprechenden Antibiotikum anwachsen, wobei jedes Anwachsen mit etwa fünf Generationen abgeschätzt wird (Derntl, 2009). Der Status der gesamten Kultur kann mittels PCR überwacht werden. Insgesamt ist davon auszugehen, dass sich die Mutation anreichert, da ebenfalls entstehende Zellen, die homozygot für den Wildtyp sind, im selektiven Medium absterben. Anschließend wird ein Aliquot der passagierten Kultur ausgestrichen, um Kolonien zu erhalten, welche sich im Idealfall aus einer einzelnen Zelle entwickelt haben. Diese werden als Vorkultur wachsen gelassen (2.2.2.4) und mittels PCR getestet. Die homozygote Mutante ist anschließend mit einer weiteren Methode wie zum Beispiel Southern Blot zu bestätigen.

Ergebnisse und Diskussion

3.1.2 Deletionsmutanten von ϕ Ch1

Deletionsmutanten von ϕ Ch1 können erzeugt werden, indem eine ähnliche Methode wie bei *Nab. magadii* L13 angewandt wird, während sich der Phage im lysogenen Stadium befindet, also in das Genom seines Wirts integriert ist (Selb, 2010). Um eine homozygote Mutante des Phagen zu erhalten, kann dieser anschließend analog zu L13-Mutanten passagiert werden.

Für Phagen gibt es auch eine schnellere Methode als das Passagieren mit dem Wirtsgenom, nämlich die Neuinfektion von *Nab. magadii* L13 mit mutanten Phagenpartikeln. Hierbei macht man sich zwei Effekte zunutze. Zum einen ist bekannt, dass nur ein Phagenpartikel jeweils eine Zelle infiziert und diese vor einer Superinfektion durch weitere Phagen schützt. Zum anderen darf davon ausgegangen werden, dass auch bei einem bestätigten Ersatz des zu deletierenden Gens durch seine disruptierte Variante noch sehr viele Wildtypkopien des Gens in der Zelle vorliegen. Somit sollte sich die Deletion in der heterozygoten Kultur kaum oder gar nicht auf die Eigenschaften des Phagen auswirken. Lässt man daher die heterozygote Kultur vollständig lysieren, entfernt zuverlässig die verbliebenen Archaeazellen und infiziert mit den gewonnenen Phagenpartikeln den Wirt erneut mit der Methode des Phagentiters (siehe Abschnitt 2.2.3.2), können durch Ausstechen der Plaques und Überführen in Medium mit selektivem Antibiotikum homozygote Deletionsmutanten von ϕ Ch1 erzielt werden (Selb, 2010). Da die Bildung von Plaques jedoch voraussetzt, dass die – mutanten – Phagenpartikel weiterhin in der Lage sind ihren Wirt zu infizieren, ist die beschriebene Methode nur für Mutationen anwendbar, welche diese Fähigkeit nicht beeinträchtigen. Versagt diese Methode der Neuinfektion, muss die homozygote Mutante durch Passagieren erzeugt werden.

3.2 Flagellum-Deletionsmutante von *Nab. magadii* L13

3.2.1 Ausgangssituation

Das Flagellum von *Nab. magadii* ist von besonderem Interesse, da es eine mögliche Interaktionsstelle mit dem Phagen ϕ Ch1 darstellt. Es wurde festgestellt, dass der C-Terminus des gp34₅₂ von ϕ Ch1 eine Galaktosebindungsdomäne aufweist (Rössler *et al.*, in Vorbereitung). Vom C-Terminus wird angenommen, dass er an glykosylierten Oberflächenproteinen des Wirts

Ergebnisse und Diskussion

bindet, worauf die Infektion folgt. Im Fall von *Nab. magadii* sind zwei in Frage kommende Proteinstrukturen bekannt, nämlich die S-Schicht und das Flagellum. Letzteres wird vom „Flagellin-Operon“ kodiert, welches aus den ORFs 1 bis 4 besteht. Von deren Produkten sind nur zwei glykosyliert, dabei handelt es sich um jene von ORF1 und ORF2, auch als FlaB1 und FlaB2 bezeichnet (Serganova *et al.*, 2002).

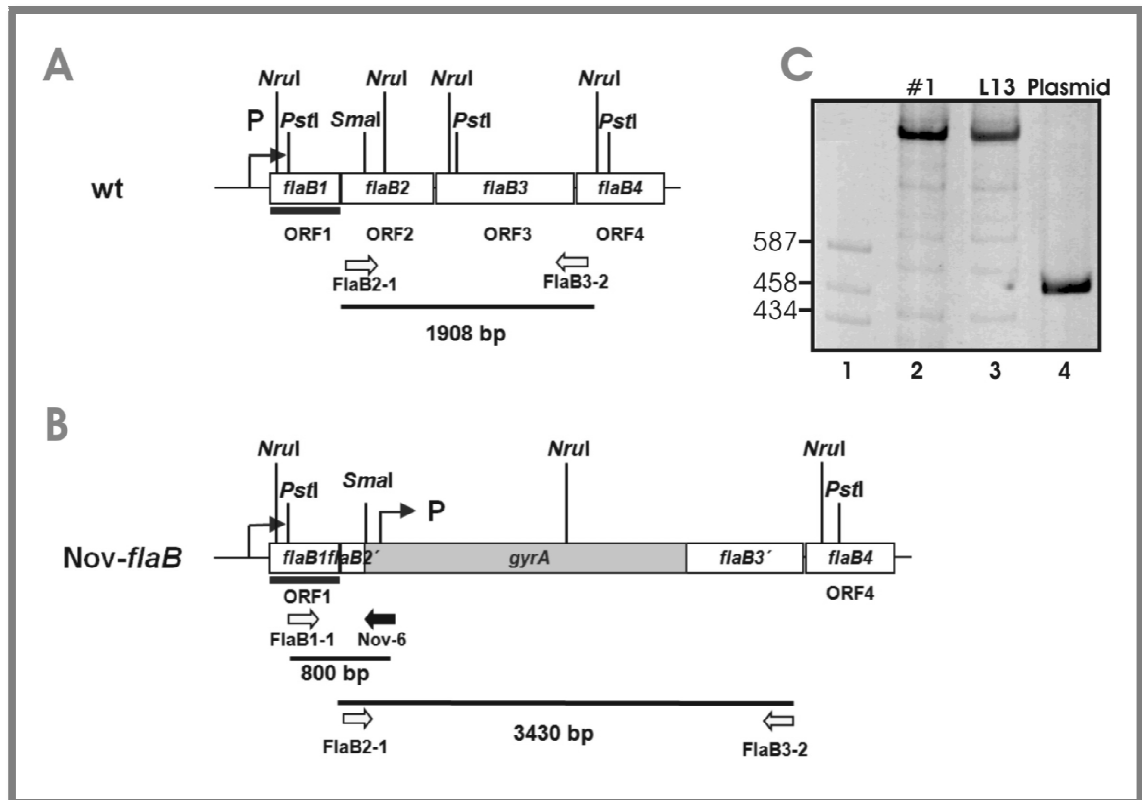


Abbildung 8: Flagellin-Operon von *Nab. magadii*

Unter A ist der Wildtyp des „Flagellin-Operons“ (Serganova *et al.*, 2002) dargestellt. Die Konstruktion der Disruption ist mit B bezeichnet. Die Resistenzkassette für Novobiocin wurde mit dem Restriktionsenzym *SmaI* eingefügt. Korrekte Orientierung und Anzahl der eingefügten Kassetten wurden überprüft (Labor Angela Witte, Daten nicht angeführt). Das Konstrukt wurde in einen Blueskript-Vektor (pKS_{II}⁺) kloniert und in *Nab. magadii* L13 transformiert.

Ebenfalls angeführt sind Primer und Produkte der analytischen PCRs: FlaB1-1 und Nov-6 binden in der Sequenz von *flaB1* bzw. innerhalb der Resistenzkassette. Das PCR-Produkt der Primer FlaB2-1 und FlaB3-2 zeigt sowohl den Wildtyp (1908 bp) als auch die eingefügte Resistenzkassette (3430 bp). Als Negativkontrolle bei der gezeigten PCR diente ein Template von *Nab. magadii* L13 (Spur 3), als Positivkontrolle das transformierte Plasmid pKS_{II}⁺ (delta)*flaB2::novR* (Spur 4). „#1“ bezeichnet die erste getestete Kultur (siehe auch Abschnitt 3.2.2), zu sehen in Spur 2.

Grafik und Text selbst erstellt

Ergebnisse und Diskussion

Um die Theorie der Infektion über diese glykosylierten Proteinstrukturen zu überprüfen, soll eine entsprechende Deletionsmutante konstruiert und anschließend die Infizierbarkeit des Stammes *Nab. magadii* L13 durch ϕ Ch1 untersucht werden. Da die S-Schicht einerseits essenziell für die Stabilität der Zellen ist und andererseits von einer Vielzahl von Genen reguliert wird, ist deren Deletion hinfällig. Die Entfernung mittels Enzymen analog zur Transformation erscheint möglich, aber nicht zweckmäßig. Dadurch würden nicht nur die Zellen destabilisiert, vor allem aber könnte die Vollständigkeit der Entfernung nicht garantiert werden, was wiederum die Ergebnisse von folgenden Experimenten verfälschen würde. Aus diesen Gründen wird versucht, eine Flagellum-Deletionsmutante zu erzeugen.

3.2.2 Transformation und Kontrolle der Transformanden

Nab. magadii L13 wurde kompetent gemacht, transformiert und Vorkulturen wachsen gelassen (siehe Abschnitte 2.2.2.1, 2.2.2.2 und 2.2.2.4). Diese wurden mittels analytischer PCR auf den Erfolg der genomischen Integration der Konstruktion überprüft. Es wurden die Primer FlaB1-1 und Nov-6 verwendet, wobei Nov-6 innerhalb der Novobiocinkassette bindet (siehe Abbildung 8). Das erwartete Produkt hat eine Länge von 800 bp. Als Positivkontrolle für die PCR wurde das transformierte Plasmid eingesetzt, als Negativkontrolle diente ein *Nab. mgadii* L13-Template.

Das erhaltene PCR-Produkt weicht bezüglich der Größe deutlich von den berechneten 800 bp ab. Es weist eine Länge von ca. 470 bp auf, ist jedoch klar vom Signal der Negativkontrolle zu unterscheiden. Die Vorkultur mit der Nummer 187 erwies sich als positiv (siehe Abbildung 9) und wurde passagiert, um eine homozygote Mutante zu erhalten.

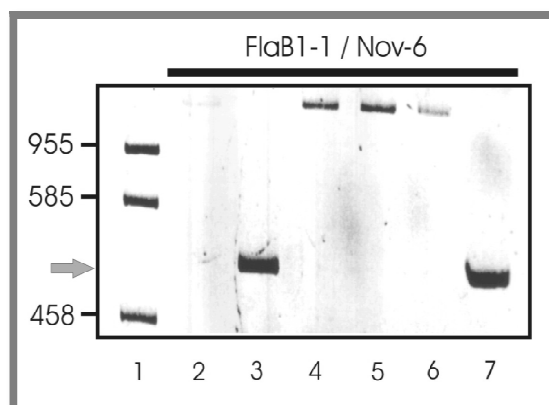


Abbildung 9: Bestätigung von *Nab. magadii* L13- Δ fla

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der analytischen PCR mit den Primern FlaB1-1 und Nov-6. Es wurden Templates der transformierten Kulturen 186 bis 190 (Spuren 2 bis 6) verwendet, weiters ist die Positivkontrolle in Spur 7 zu sehen. Das gewünschte Signal wird durch einen Pfeil angezeigt. Die Kultur 187 – zu sehen in Spur 3 – wurde erfolgreich transformiert. Grafik und Text selbst erstellt

Ergebnisse und Diskussion

3.2.3 Homozygote Mutante

Da in den Zellen von *Nab. magadii* etwa 25 Kopien des Genoms vorliegen, handelt es sich trotz des positiven Signals der analytischen PCR um eine heterozygote Mutante. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 ausgeführt, wird die positiv getestete Kultur 187 in weiterer Folge passagiert mit dem Ziel, die Mutante homozygot zu erhalten. Um den Fortschritt zu kontrollieren, empfiehlt es sich, jede Passage mittels PCR sowohl auf die eingebrachte Deletion als auch auf den Wildtyp bzw. die Resistenzkassette zu überprüfen.

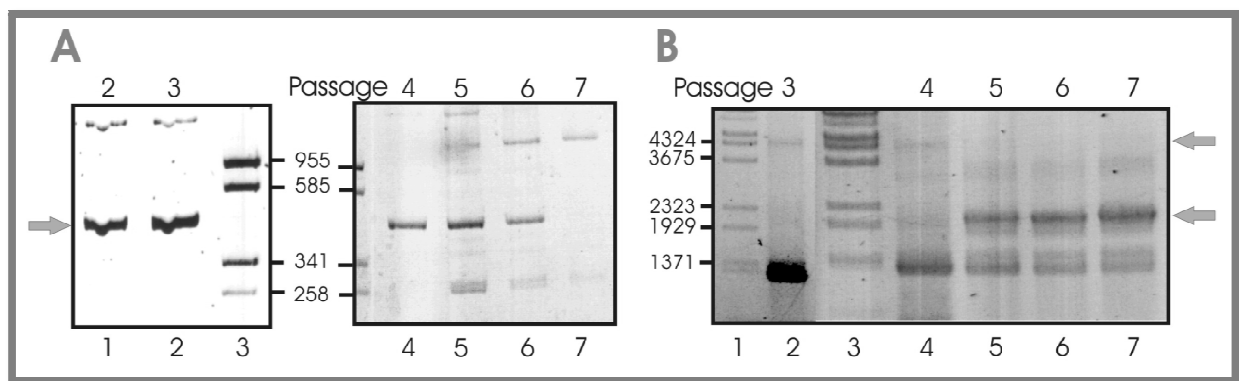


Abbildung 10: Kontroll-PCRs mehrerer Passagen von *Nab. magadii* L11-ΔE

Zu sehen sind jene PCRs, die zur Kontrolle des Fortschritts beim Passagieren durchgeführt wurden. Oberhalb der Spur ist jeweils angegeben, welche Passage der Kultur 187 als Template für die PCR eingesetzt wurde.

Grafik A zeigt die mit den Primern FlaB1-1 und Nov-6 durchgeführte PCR, welche das Vorhandensein der eingebrachten Deletion anzeigt. In Grafik B wird die Kontroll-PCR für Wildtyp bzw. Resistenz dargestellt, hierfür wurden die Primer FlaB2-1 und FlaB3-2 verwendet. Die schematische Darstellung des genetischen Konstrukts inklusive Primerbindungsstellen findet sich in Abbildung 8. Die dort dargestellten PCR-Produkte sind hier durch die Pfeile (Grafik A: Deletion bei 450 bp; Grafik B: Wildtyp bei 1900 bp, Resistenz bei 3900 bp) hervorgehoben.

Grafik und Text selbst erstellt

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Kontrolle auf die Deletion (Grafik A) und auf den Wildtyp bzw. die Resistenz (Grafik B) dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, wie im Lauf des Passagierens das Signal der Deletion bzw. der Resistenz verschwindet (A: Pfeil bei 450 bp; B: oberer Pfeil bei 3900 bp), im Gegenzug erscheint wieder jenes des Wildtyps (B: Pfeil bei 1900 bp). Ab Passage 5 (Spur 5 in A und B) sind die PCR-Produkte, die den Wildtyp anzeigen, wieder klar zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.4 Diskussion

Die PCR-Ergebnisse in Abbildung 10 belegen klar, dass die Deletion nahezu sofort durch den Wildtyp ersetzt wird und es zu keiner Anreicherung der betreffenden Genomkopien kommt, wie man dies nach Abbildung 7 erwarten könnte. Dies erscheint noch ungewöhnlicher, als das Flagellum bei der vorliegenden Form der Kultivierung (Flüssigmedium, geschüttelt in Schikane-Erlenmeyerkolben) nicht von allzu großer Bedeutung sein sollte.

Somit stellt sich die Frage, aus welchem Grund die eingebrachte Mutation derart instabil ist. Denkbar wäre, dass sich im Bereich des Flagellin-Operons bislang unidentifizierte regulatorische Sequenzen befinden, die bei der homologen Rekombination zwischen dem Chromosom und dem Deletionskonstrukt beschädigt wurden. Alternativ könnte die Rekombination unbeabsichtigterweise heterolog stattgefunden haben, sodass ein anderer Bereich des Genoms von der Deletion betroffen ist. Gegen diese Überlegung spricht das PCR-Ergebnis, welches in Abbildung 10 (Grafik B, Spuren 2 und 4) zu sehen ist. In diesen ist die für den Wildtyp zu erwartende Bande kaum zu erkennen. Erst in den darauf folgenden Passagen wird das entsprechende Signal wieder deutlich stärker. Das Fehlen der Wildtypbande in den beschriebenen Spuren ist nur durch eine homologe Rekombination und den Ersatz des Wildtyps durch seine disruptierte Variante zu erklären.

Bislang wurde für das Passagieren die Kultivierung in Flüssigmedium eingesetzt. Aufgrund der geschilderten Ergebnisse wird nun ein alternativer Ansatz gewählt, nämlich das Passagieren über einen Vereinzelausstrich auf NVM⁺-Agarplatten mit Novobiocin. Zwar ist der Zeitbedarf dieser Methode deutlich größer, doch können jeweils Einzelkolonien auf den Fortschritt des Passagierens hin überprüft werden. So ergibt sich ein genaueres Bild vom Zustand der Kultur, welches hilfreich für die Auswahl jener Kolonie ist, mit der weitergearbeitet werden soll.

Parallel wird eine alternative Strategie verfolgt. Anders als bisher sollen dabei die ORFs 2 und 3 vollständig durch die Resistenzkassette ersetzt werden. Die Transformation des entsprechenden Konstrukts lieferte bislang keine positiven Transformanten.

3.3 Deletion ORF11 von ϕ Ch1

3.3.1 Ausgangssituation

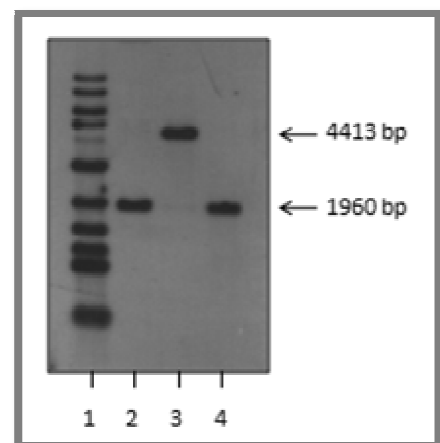
Nach der erfolgreichen Deletion der NEP in *Nab. magadii* L13 (Derntl, 2009) wurde die dafür verwendete Methode für die Mutation des ins Genom integrierten Prophagen ϕ Ch1 angepasst (Selb, 2010). Der zu deletierende ORF wurde derart kloniert, dass er von der Resistenzkassette für Novobiocin unterbrochen wird und diese flankiert. Dieses Konstrukt wurde in einen Vektor ohne Replikationsursprung für *Nab. magadii* eingebaut und in *Nab. magadii* L11 transformiert, um eine homologe Rekombination zu erreichen. Für diese Versuchsreihe wurden drei unterschiedliche ORFs von ϕ Ch1 gewählt: ORF11, ORF79 und ORF93. Mit dem ORF11 wird ein ORF bekannter Funktion gewählt. Dieser codiert für Protein E, ein Kapsidprotein des Phagen – ebenfalls besprochen in Abschnitt 1.3.4 (Klein *et al.*, 2002). Da es sich beim Protein E um das Hauptkapsidprotein handelt (Witte *et al.*, 1997), ist bei der homozygoten Deletionsmutante *Nab. magadii* L11- Δ E ein Phänotyp hinsichtlich der Phagenpartikel zu erwarten. Es kann angenommen werden, dass die Hülle nicht korrekt assembliert, wodurch die Bildung der Partikel erschwert sein dürfte. Daraus abgeleitet, sind derartige Phagen vermutlich nicht in der Lage, erneut ihren Wirt zu infizieren. Obwohl es sich um eine Deletion im Genom des Phagen handelt, kann daher nicht die gleiche Strategie angewandt werden wie bei der Deletion des ORF79 von ϕ Ch1 (siehe Abschnitt 3.1.2 bzw. 3.4.1). Es muss auf die Methode des Passagierens zurückgegriffen werden, um nach erfolgter homologer Rekombination eine für die Deletion homozygote Kultur zu erhalten.

Abbildung 11: Southern Blot *Nab. magadii* L11- Δ E

Die Abbildung zeigt einen Southern Blot zur Bestätigung des Vorliegens einer homozygoten Kultur von *Nab. magadii* L11- Δ E. Spur 1 zeigt den Marker, Spur 2 die unpassagierte Kultur *Nab. magadii* L11- Δ E, Spur 3 die passagierte Kultur 11- Δ E nach der 22. Passage. In Spur 4 befindet sich als Kontrolle der Stamm *Nab. magadii* L11.

Detektiert wurde der ORF11. In Spur 3 sind auf Höhe des Wildtypsignals (1960 bp) noch Reste desselben erkennbar. Somit ist die Kultur immer noch heterozygot.

Grafik und Text von Labor Angela Witte



Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung 11 zeigt den genetischen Status des Stammes *Nab. magadii* L11-ΔE zum Zeitpunkt der Übernahme dieses Projektes. Der passagierte Stamm (Abbildung 11, Spur 3) enthält noch Reste des Wildtypgenoms und ist daher heterozygot in Bezug auf die Deletion des ORF11. Daher muss weiter passagiert werden, bis der Nachweis einer homozygoten Kultur erbracht ist.

3.3.2 Ergebnisse

Die erhaltene Kultur (*Nab. magadii* L11-ΔE Passage 22) wurde mehrfach passagiert. Aus den Passagen wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, Templates hergestellt, um sie mittels PCR auf das Vorhandensein von Wildtyp- bzw. disruptierter Variante des ORF11 zu überprüfen.

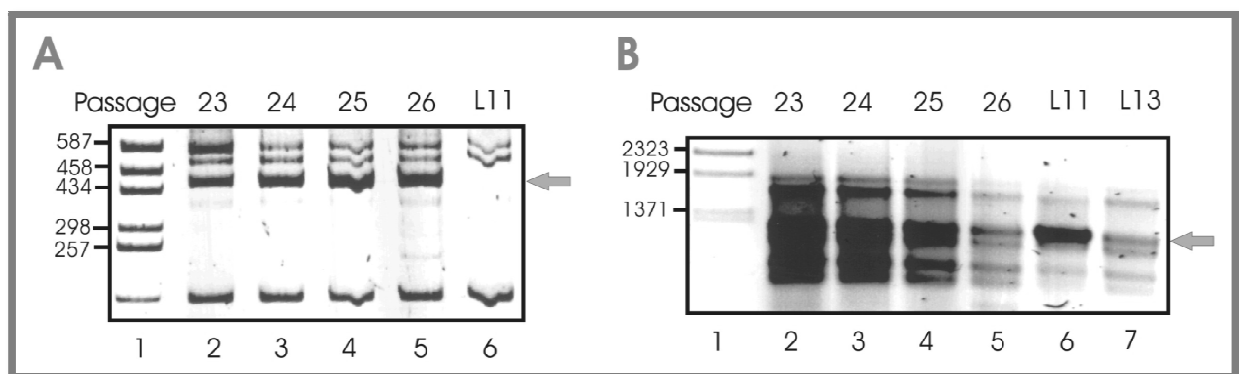


Abbildung 12: Kontroll-PCRs mehrerer Passagen von *Nab. magadii* L11-ΔE

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse jener PCRs, die zur Kontrolle des Fortschritts beim Passagieren durchgeführt wurden. Oberhalb jeder Spur ist angegeben, welche Passage des heterozygoten Stammes *Nab. magadii* L11-ΔE als Template für die jeweilige PCR eingesetzt wurde.

In Grafik A ist die PCR mit Primern E-HB-51 und Nov-9 dargestellt. Der Primer Nov-9 bindet innerhalb der Novobiocin-Resistenzkassette. Das erwartete Produkt zeigt die eingebrachte Deletion und hat eine Länge von 440 bp. L11 (Spur 6) dient als Negativkontrolle. In Grafik B sieht man die Testergebnisse derselben Passagen, getestet wurde in diesem Fall auf Reste des Wildtyps. Es wurden die Primer E-HB-51 und E-HB-3 verwendet, welche bei Vorhandensein des ORF11 ein Produkt von etwa 1200 bp liefern. L11 (Spur 6) dient als Positiv-, L13 in Spur 7 als Negativkontrolle.

In beiden Grafiken ist besonders auf die Passage 26 (jeweils Spur 5) zu achten. Es zeigen sich genetische Veränderungen, erkennbar durch zusätzliche PCR-Produkte.

Grafik und Text selbst erstellt

Ergebnisse und Diskussion

Für die Kontroll-PCRs wurden zwei Primerpaare eingesetzt, von denen E-HB-51 und E-HB-3 den Wildtyp bzw. die Resistenzkassette detektieren (1200 bzw. 3700 bp). Das andere Primerpaar, bestehend aus E-HB-51 und Nov-9, zeigt die eingebrachte Insertion durch ein Produkt von 440 bp an. In den zugehörigen Ergebnissen der Passagen 22 bis 26 – zu sehen in Abbildung 12 – konnte eine Veränderung im Genom bei Passage 26 festgestellt werden: In Grafik A, Spur 5 zeigen sich zusätzliche Banden.

Als Konsequenz wurde von Passage 25 ein Vereinzelausstrich auf einer NVM⁺-Platte mit Novobiocin angefertigt, die Kolonien wurden als Vorkultur wachsen gelassen und erneut per PCR getestet. Von zwanzig überprüften Einzelkolonien wiesen nur die Kulturen 12 und 16 die Deletion des ORF11 auf (Abbildung 13, Grafik A). In beiden wurde anschließend versucht, die Resistenzkassette im ORF 11 nachzuweisen, was für die Kultur 16 ein klar positives Signal ergab. Trotz der fehlenden Bande für die Resistenz in Kultur 12 wurden beide Kulturen mittels Southern Blot (Abschnitt 2.2.6.12) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 13, Grafik C dargestellt.

Für den Southern Blot wurde von den Kulturen 12 und 16 sowie vom Stamm *Nab. magadii* L11 chromosomale DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2.6) und mit den *EcoRV* und *BglII* möglichst vollständig geschnitten. In Abbildung 13, Grafik C sind in den Spuren die jeweils darüber angegebenen Kulturen enthalten. In den Spuren 3, 5 und 7 handelt es sich um die Schnitte mit *BglII*, in Spuren 2, 4, und 6 befinden sich die Schnitte mit *EcoRV*. Der Southern Blot wurde nach den Angaben in Abschnitt 2.2.6.12 durchgeführt. Als Sonde diente der ORF11, welcher aus dem Plasmid „pKS_{II}⁺ gpE“ ausgeschnitten wurde. Es sind folgende Signale zu erwarten, deren Höhen in der Grafik mit einem Pfeil markiert wurden:

Stamm	<i>BglII</i>	<i>EcoRV</i>
<i>Nab. magadii</i> L11	2204 bp	1960 bp
<i>Nab. magadii</i> L11-ΔE	4652 bp	4413 bp

Sowohl bei Kultur 12 als auch bei Kultur 16 sind noch immer Reste des Wildtyps vorhanden, klar erkennbar in den Spuren 2, 3, und 4.

Ergebnisse und Diskussion

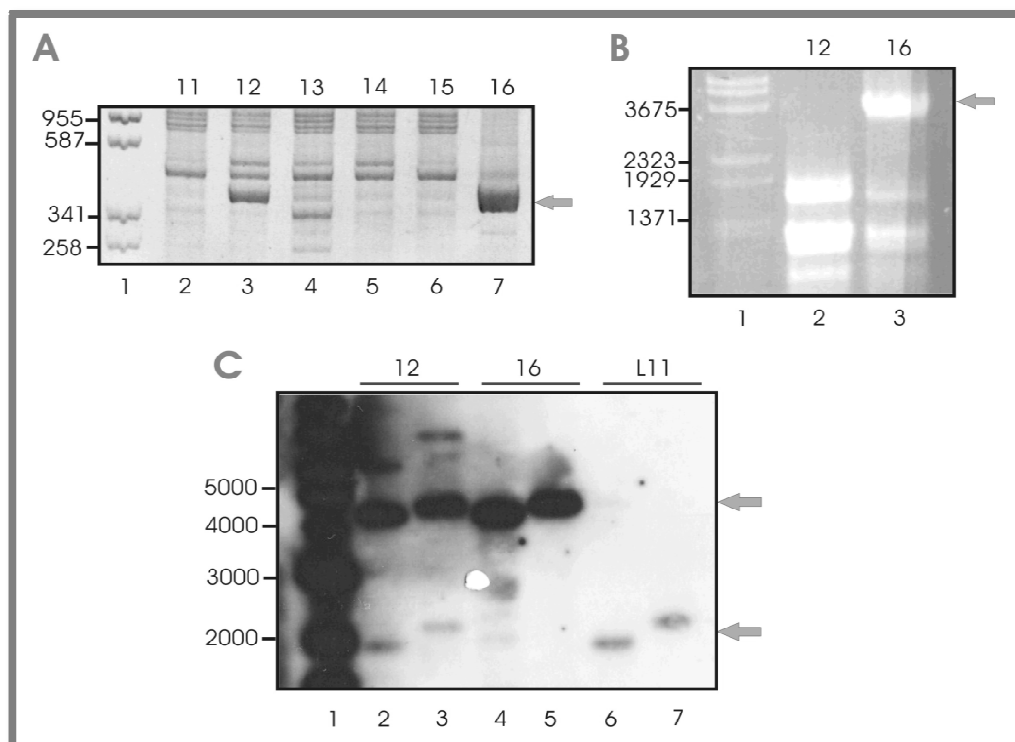


Abbildung 13: Untersuchung von *Nab. magadii* L11-ΔE (Passage 25)

A zeigt die PCR-Ergebnisse, mit denen Einzelkolonien, erhalten aus dem Vereinzelungsausstrich der Stammes *Nab. magadii* L11-ΔE (Passage 25), überprüft wurden. In A findet sich die Kontrolle der eingebrachten Deletion, in B jene für die Resistenz. Das jeweils erwartete PCR-Produkt ist durch einen Pfeil markiert. Anhand der Ergebnisse wurden die Kulturen 12 (A: Spur 3, B: Spur 2) und 16 (A: Spur 7, B: Spur 3) für einen Southern Blot zum Nachweis der Deletion bzw. des Wildtyps ausgewählt.

Der resultierende Southern Blot ist unter C zu sehen. Oberhalb der Spuren ist angegeben, um welche Kultur es sich handelt. Bei beiden zu kontrollierenden Kulturen (Spuren 2 bis 5) sind Reste des Wildtyps sichtbar (vergleiche L11, Spuren 6 und 7).

Grafik und Text selbst erstellt

3.3.3 Diskussion

Der Stamm *Nab. magadii* L11-ΔE sollte – sobald er homozygot vorliegt – hinsichtlich möglicher Phänotypen, wie sie bei der Phagenfreisetzung zu vermuten sind, charakterisiert werden. Weiters sollte die Hülle von aus diesem Stamm freigesetzten Phagenpartikeln auf Defekte untersucht werden. Unglücklicherweise konnte keine dieser Untersuchungen durchgeführt werden, da der Stamm nach wie vor heterozygot ist (Abbildung 13).

3.4 *Nab. magadii* L11- Δ ORF79

3.4.1 Ausgangssituation

Wie auch der Stamm *Nab. magadii* L11- Δ E wurde *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 im Rahmen einer Versuchsreihe konstruiert. Für diese wurden drei unterschiedliche ORFs von ϕ Ch1 gewählt: ORF11, ORF79 und ORF93. Während mit ORF11 ein ORF mit bekannter Funktion gewählt wurde, lagen für den ORF79 keinerlei Informationen vor. Es gab auch keine Hinweise auf Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen (Klein *et al.*, 2002). Gerade wegen der fehlenden Informationen war dieser ORF ein interessanter Kandidat für die Konstruktion einer Deletionsmutante. Erste Wachstumskurven des homozygoten *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 zeigten im Vergleich mit dem Stamm *Nab. magadii* L11 einen deutlich früheren Beginn der Lyse (Selb, 2010).

An dieser Stelle setzt die gegenständliche Arbeit an. Zum einen soll der Stamm *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 komplementiert werden, zum anderen stellt sich die Frage nach Unterschieden im Genexpressionsmuster von *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79.

3.4.2 Vergleich Expressionsmuster *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79

Für den Vergleich der Expressionsmuster wurde zunächst eine Zeitreihe aufgenommen. Die Vorkulturen der zu vergleichenden Stämme befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Beide Kulturen wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angesetzt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Messung der OD₆₀₀ erfolgte zweimal täglich, konkret zu folgenden Zeitpunkten: 18, 27, 43, 52, 67, 74, 91, 98, 115 und 139 Stunden nach Inokulation. Zu diesen Zeitpunkten wurde je eine Probe wie in den Abschnitten 2.2.1.2 und 2.2.1.5 beschrieben vorbereitet. Der Überstand aus 2.2.1.2 wurde nicht verworfen, sondern in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Abschnitt 2.2.1.5 für eine Phagentiteranalyse vorbereitet.

Die gewonnenen Proben wurden mittels Western Blot (Abschnitt 2.2.5.3) analysiert. Es wurden vier unterschiedliche primäre Antikörper ausgewählt, die gegen das gp34, gegen die gesamten Hüllenproteine, das Hauptkapsidprotein E bzw. gegen die Methyltransferase des Phagen ϕ Ch1

Ergebnisse und Diskussion

gerichtet sind (siehe Abschnitt 2.1.7). Bei diesen Antikörpern wurden folgende Verdünnungen eingesetzt:

α -ORF34	1:2500 in 1x TBS mit 0,3 % BSA
α - ϕ Ch1	1:5000 in 1x TBS mit 0,3 % BSA
α -E	1:2500 in 1x TBS mit 0,3 % BSA
α -mtase	1:1000 in 1x TBS mit 0,3 % BSA

Als sekundärer Antikörper kam α -rabbit (HRP) in der Verdünnung 1:5000 in 1x TBS zum Einsatz. Für die Western Blots wurden jeweils 10 μ l der Proben, die zu den Zeitpunkten 18, 27, 43, 52, 67, 74, 98 und 115 Stunden nach Inokulation genommen wurden, geladen. Dies galt sowohl für die Proben von *Nab. magadii* L11 als auch für jene von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79.

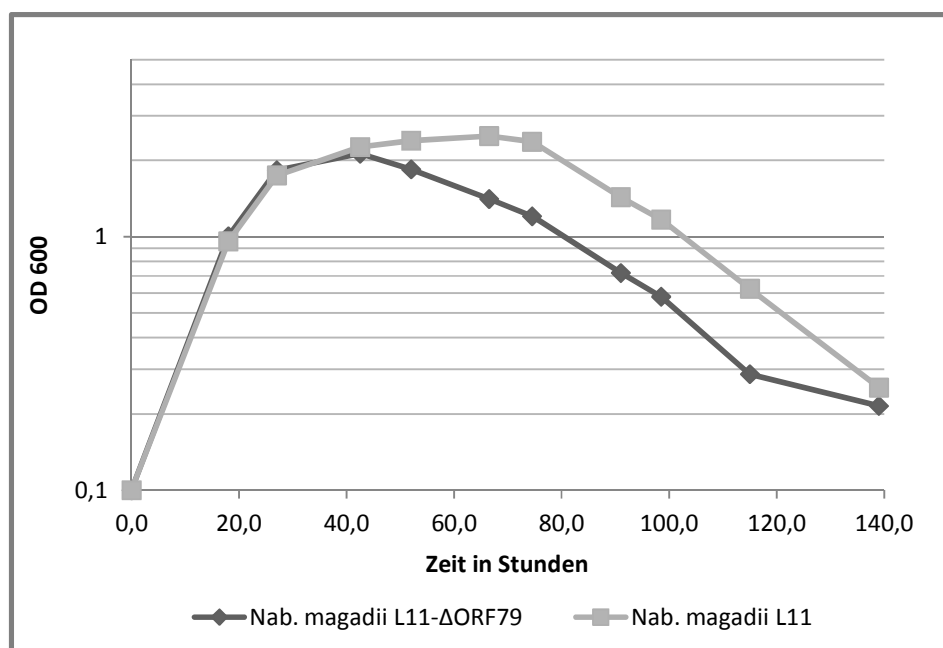


Abbildung 14: Wachstumskurven von *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79

Die Kulturen von *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 18, 27, 43, 52, 67, 74, 98 und 115 Stunden nach Inokulation wurden sowohl die OD₆₀₀ bestimmt als auch Proben gezogen (siehe Abschnitte 2.2.1.2 und 2.2.1.5).

Grafik und Text selbst erstellt

Ergebnisse und Diskussion

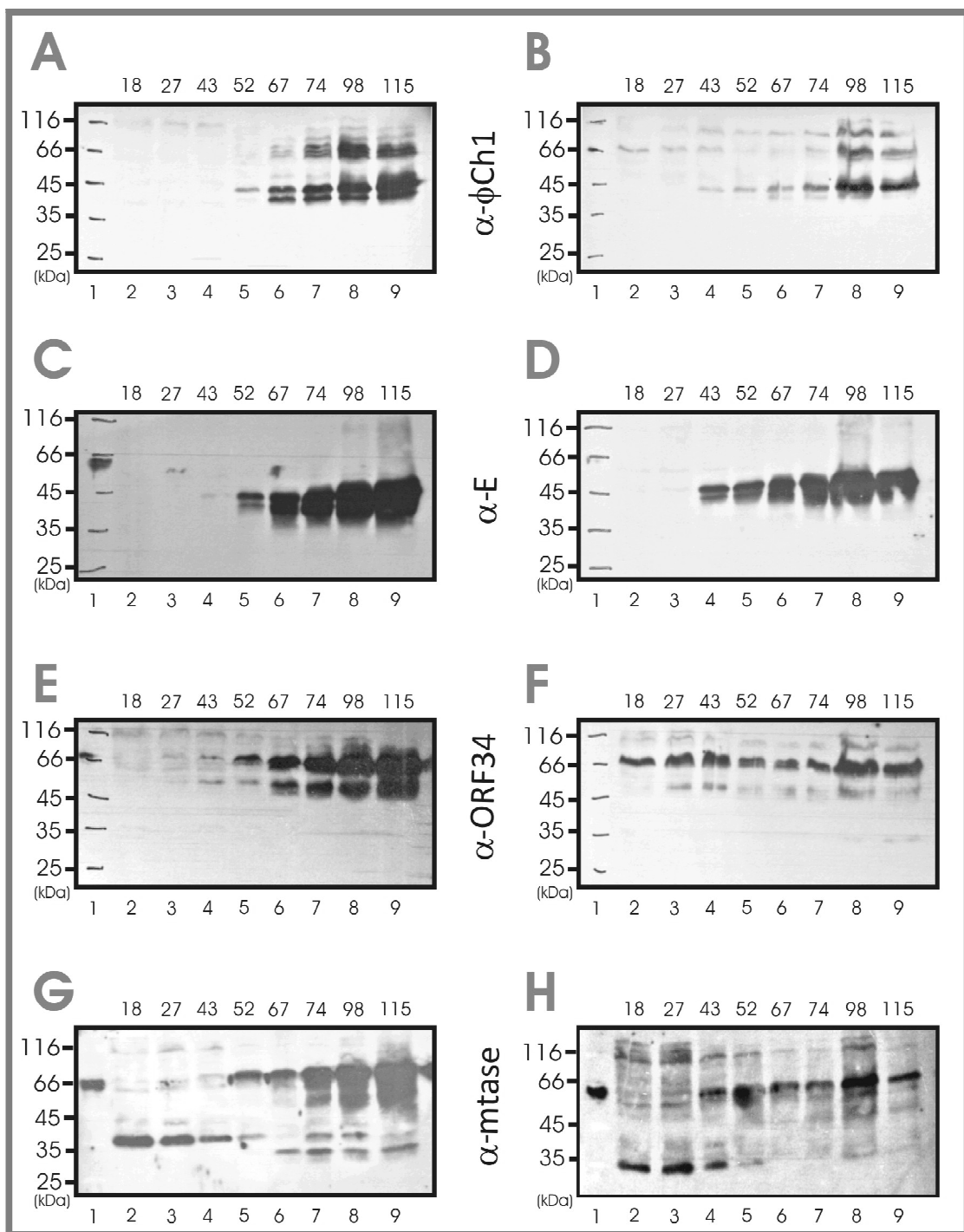


Abbildung 15: Vergleich der Expressionsmuster *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79

Die Beschreibung der Abbildung 15 findet sich auf der folgenden Seite.

Ergebnisse und Diskussion

Beschreibung Abbildung 15 (vorige Seite)

Die zu den Blots zugehörige Wachstums- bzw. Lysekurve findet sich in Abbildung 14. Die Lyse begann bei *Nab. magadii* L11 rund 70 Stunden nach Inokulation, bei *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 bereits bei der 50. Stunde.

Die Grafiken A, C, E und G zeigen die Western Blots der Proben von *Nab. magadii* L11, diese befinden sich jeweils auf der linken Seite der Abbildung. Die Grafiken B, D, F und H zeigen die Western Blots der Proben von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79, diese befinden sich jeweils auf der rechten Seite der Abbildung. Zwischen den Grafiken ist angegeben, welcher primäre Antikörper für den rechts bzw. links befindlichen Western Blot verwendet wurde. Die Zahlen über den Spuren geben an, zu welchem Zeitpunkt die aufgetragene Probe gezogen wurde (Angabe in Stunden ab Inokulation). Für die Auswertung derjenigen Western Blots, bei denen derselbe primäre Antikörper verwendet wurde, wurde die Belichtungszeit jeweils identisch gewählt. Somit sind in der Abbildung bei in derselben Zeile befindlichen Grafiken die Signalstärken der Größenordnung nach vergleichbar, nicht aber bei Grafiken aus unterschiedlichen Zeilen.

Grafik und Text selbst erstellt

Die Ergebnisse dieser Blots sind in Abbildung 15 dargestellt. Im linken Teil der Abbildung finden sich die Ergebnisse der Proben *Nab. magadii* L11, im rechten Teil jene von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79. Die Grafiken einer Zeile zeigen jeweils Blots, die mit dem gleichen primären Antikörper analysiert wurden. Dessen Bezeichnung ist zwischen den Grafiken angegeben. Die Zahl oberhalb der Spuren gibt den Probenahmezeitpunkt in Stunden ab Inokulation an, der Verlauf der zugehörigen Wachstumskurve kann der Abbildung 14 entnommen werden. Die Signalstärke der Blots ist jeweils pro Zeile der Größenordnung nach vergleichbar, da die Filme beider Blots für die gleiche Zeitdauer belichtet wurden.

Sowohl Protein E als auch die anderen Hüllenproteine (Antikörper α - ϕ Ch1) können bei *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 deutlich früher nachgewiesen werden als bei *Nab. magadii* L11 (Grafik A und C, jeweils Spur 5; Grafik B und D, jeweils Spur 4). Bemerkenswert ist der Unterschied zwischen den Grafiken E und F, ebenso wie zwischen den Grafiken G und H. Während die Expression des ORF34 in *Nab. magadii* L11 ähnlich den Kapsidproteinen von ϕ Ch1 (Grafiken A und C, jeweils Spur 5) zum ersten Mal in Spur 4 nachgewiesen wird, ist dieses in den Proben von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 bereits von Anfang an vorhanden (Grafik F, Bande bei 66 kDa). Darüber hinaus kann keine Steigerung des Signals im Verlauf der Zeitreihe festgestellt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man die Grafiken G und H in Abbildung 15, zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen *Nab. magadii* L11 und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79. Das Signal der Methyltransferase ergibt in Grafik H einen ähnlichen Verlauf, wie er bereits für die Kapsidproteine von ϕ Ch1- Δ ORF79 beobachtet werden konnte (Grafik B und D). Jedoch fällt auf, dass dieses im Vergleich zum Wildtyp in Grafik G deutlich schwächer ausfällt. Zwar gilt dies ebenfalls für die erwähnten Kapsidproteine in den Grafiken B und D, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß.

3.4.3 Komplementierung von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79

Die Komplementierung des Stammes *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 soll durch Transformation des Plasmids pNB102-prom49-ORF79 erfolgen. Die Klonierungsstrategie kann unter 2.2.7.5 nachgelesen werden. Das Plasmid pNB102 enthält eine Resistenzkassette für Mevinolin, welche die Selektion der positiven Transformanden erleichtert. Dieser zusätzliche Marker ist notwendig, da Novobiocin bereits als Marker für die ursprüngliche Deletion eingesetzt wurde und daher für die Komplementierung nicht mehr zur Verfügung steht. Für die Regulation des ORF79 wurde der konstitutive Promotor des ORF49 ausgewählt.

Obwohl die Möglichkeit besteht, den Stamm *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 direkt zu transformieren, wird aufgrund der Tendenz zur früheren Lyse ein anderer Weg gewählt. Es wird zunächst das Plasmid pNB102-prom49-ORF79 in *Nab. magadii* L13 transformiert und die Transformanden durch PCR bestätigt (siehe Abschnitte 2.2.2.1, 2.2.2.2 und 2.2.2.4). Anschließend wird eine stationäre Kultur des positiven Transformanden für einen Phagentiter (Abschnitt 2.2.3.2) verwendet und mit ϕ Ch1- Δ ORF79 (Aufreinigung der Phagenpartikel siehe Abschnitt 2.2.3.1) infiziert. Eine infizierte Kultur kann angesetzt werden, indem mit einer sterilen Pasteurpipette der Rand eines Plaques ausgestochen und in NVM⁺ mit zugesetztem Mevinolin und Novobiocin transferiert wird.

Die so erhaltene Kultur kann nun mittels PCR überprüft werden, ob die Deletion des ORF79 noch intakt und das Plasmid pNB102-prom49-ORF79 enthalten ist oder ob der ORF79 eventuell durch erneute – wenn auch nicht beabsichtigte – homologe Rekombination wieder im Genom

Ergebnisse und Diskussion

integriert ist. Ist die komplementierte Mutante durch diese Kontrollen bestätigt, wird eine Wachstumskurve aufgenommen und der Phänotyp bzw. dessen Ausbleiben überprüft.

3.4.4 Diskussion

Aus zeitlichen Gründen war es nicht möglich, die Komplementation von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 abzuschließen. Die Transformation des Plasmids pNB102-prom49-ORF79 in *Nab. magadii* L13 wurde durch PCR mit den Primern 49-KpnI und 79-Pst bestätigt (Daten nicht angeführt), ebenso erfolgte bereits die Infektion besagter Kultur mit ϕ Ch1- Δ ORF79. Die weiteren Schritte, nämlich Ausstechen der Plaques, Kontrolle der Kulturen und Aufnehmen der Wachstumskurve, sind noch durchzuführen.

Beim Vergleich der Expressionsmuster zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen *Nab. magadii* L11 (Abbildung 15, linke Seite) und *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 (Abbildung 15, rechte Seite), etwa bei der Expression des ORF34 und der Methyltransferase. Generell kann festgestellt werden, dass die Western Blots aus Proben der Deletionsmutante eine geringere Signalstärke aufweisen als jene des Wildtyps. Da alle Proben nach einer Methode (siehe Abschnitt 2.2.1.2) aufbereitet wurden, welche die optische Dichte der Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme berücksichtigt, und somit die Gesamtproteinkonzentration vergleichbar sein sollte, kann vermutet werden, dass die Konzentration der Phagenproteine im Stamm *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 etwas geringer ist als jene in *Nab. magadii* L11.

Es ist nicht geklärt, wie der Übergang vom lysogenen zum lytischen Zyklus beim Phagen ϕ Ch1 kontrolliert ist. Lediglich konnte beobachtet werden, dass der Expressionsbeginn der Kapsidproteine des Phagen zeitlich mit dem Ende des logarithmischen Wachstums seines Wirts zusammenfällt. Dies zeigte sich auch in den gegenständlichen Untersuchungen: In Abbildung 14 ist dieses Ende bei beiden Kulturen bei etwa 35 Stunden zu sehen. Von diesem Zeitpunkt an gerechnet sind Kapsidproteine bei *Nab. magadii* L11 nach knapp 20 Stunden nachweisbar, bei *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 bereits nach 8 Stunden. Fraglich bleibt, ob bei *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 tatsächlich das Ende der logarithmischen Wachstumsphase vorlag und eine im Vergleich zum Wildtyp schnellere Reaktion auf Proteinlevel auslöste oder ob umgekehrt die

Ergebnisse und Diskussion

Expression weiterer Proteine, welche nicht in den Western Blots nachgewiesen wurden, die Kultur bereits vor dem natürlichen Ende des logarithmischen Wachstums zur Expression der Phagenproteine veranlasste und das Wachstum der Kultur dadurch stoppte.

Eine zweite Intervallverkürzung kann ebenfalls beobachtet werden: Das Intervall zwischen dem ersten Auftreten der Kapsidproteine, detektiert mit den Antikörpern α - ϕ Ch1 und α -E, bis zum Beginn der Lyse ist bei *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 gegenüber *Nab. magadii* L11 um etwa die Hälfte verkürzt. Bei der Deletionsmutante kann aus dem Vergleich der Wachstumskurve mit den Western-Blot-Ergebnissen auf ein Zeitfenster von etwa 10 Stunden geschlossen werden (Grafik B und D, Spur 4, Lyse bei etwa 52 Stunden), beim Wildtyp auf rund 20 Stunden (Grafik A und C, Spur 5, Lyse bei 70 Stunden).

Aufgrund der vom Typ her unterschiedlichen Veränderungen im Expressionsmuster der untersuchten Proteine wird angenommen, dass diese vom ORF79 respektive dem gp79 über Mediatoren beeinflusst werden. Insbesondere scheint ORF79 in die Regulation der Lyse involviert zu sein. Deren Zeitpunkt ist ein für den Phagen kritischer Erfolgsfaktor: Erfolgt die Lyse zu früh, etwa bevor die Phagenpartikel fertig assembliert sind, bedeutet dies eine reduzierte Zahl an Nachkommen. Erfolgt sie zu spät, bedeutet dies ebenfalls Nachteile für den Phagen. Aufgrund der daher zu vermutenden, möglichst exakten Regulation der Lyse ist deren früherer Eintritt beim Stamm *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 und insbesondere die Verkürzung des Intervalls „Expressionsstart der Kapsidproteine“ bis Lysebeginn ein Indiz für eine wichtige Rolle des ORF79 bei deren Regulation. Ggesetzt den Fall, *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 würde „zu früh“ lysieren, also noch bevor intakte Phagenpartikel fertiggestellt sind, müsste dies in einer Phagentiteranalyse der aus der Zeitreihe gewonnenen Proben nachweisbar sein. Es würde im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Reduktion des Titors respektive der „pfu/ml“ erwartet. Die Ausführung dieser Untersuchung brachte aufgrund technischer Schwierigkeiten bislang kein Ergebnis.

Eine weitere noch durchzuführende Untersuchung ist jene des Methylierungsmusters bzw. -grades der DNA von ϕ Ch1- Δ ORF79 im Vergleich zum Wildtyp, da eine deutlich geringere Konzentration an Methyltransferase festgestellt wurde (Abbildung 15, Grafik G und H).

3.5 *Nab. magadii* P3 - Komplementation

3.5.1 Ausgangssituation

Nab. magadii P3 – auch als *Nab. magadii* L13- Δ NEP bezeichnet – war die erste Deletionsmutante bei haloalkaliphilen *Archaea*. Die Mutante weist eine durch die Novobiocin-Resistenzkassette disruptierte Variante des NEP-Gens auf, welche durch homologe Rekombination eingebracht wurde. Der Funktionsverlust der NEP (*Nab. magadii* extrazelluläre Protease) durch die Kassette wurde durch Wachstum auf Caseinplatten sowie durch Messung der Enzymaktivität durch einen Azocasein-Assay überprüft (Derntl, 2009).

Die Deletionsmutante wurde mit Hilfe des Plasmides pNB102-prt komplementiert. Auf diesem Plasmid befindet sich neben einer Resistenzkassette für Mevinolin auch das NEP-Gen unter Kontrolle des endogenen Promotors. So gesehen wäre zu erwarten, dass der Phänotyp des komplementierten *Nab. magadii* P3 jenem von *Nab. magadii* L13 entspricht. Der Versuch zeigte ein anderes Bild: *Nab. magadii* L13, *Nab. magadii* P3 und der komplementierte Stamm *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) sowie Kulturen von *Nab. magadii* L13 (pNB102) und *Nab. magadii* P3 (pNB102) wurden auf einer Caseinplatte wachsen gelassen. Sobald die Protease segregiert wird, bildet sich ein Halo rund um die Kolonie. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Halo der komplementierten Kolonie größer ist als jener der Kolonien *Nab. magadii* L13 und *Nab. magadii* L13 (pNB102-prt), zu sehen in Abbildung 16.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe eines herzustellenden Antikörpers die Expression der Protease nachzuweisen und Unterschiede zwischen *Nab. magadii* L13, *Nab. magadii* P3 und dem komplementierten Stamm *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) zu untersuchen. Von Interesse ist zum einen der Zeitpunkt des ersten Auftretens der Protease, zum anderen deren Menge, da beides Einfluss auf den Durchmesser des Halos auf Caseinplatten hat.

Ergebnisse und Diskussion

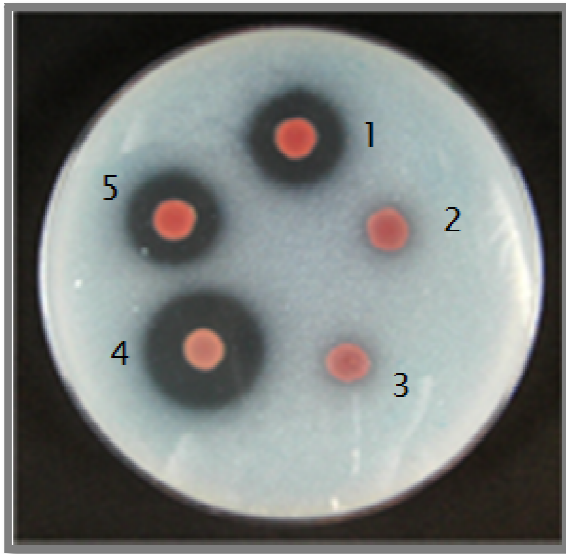


Abbildung 16: NEP-Aktivität mehrerer Stämme

Zu sehen sind die folgenden Stämme, in der Klammer sind enthaltene Plasmide angeführt:

1 *Nab. magadii* L13

2 *Nab. magadii* P3

3 *Nab. magadii* P3 (pNB102)

4 *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt)

5 *Nab. magadii* L13 (pNB102)

Rund um Kolonien, welche die NEP exprimieren, bildet sich ein klarer Halo aufgrund des Abbaus des Caseins durch die Protease. Die komplementierte Kolonie *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt), zu sehen bei 4, weist einen deutlich größeren Hof auf als *Nab. magadii* L13, zu sehen bei 1.

Grafik und Text adaptiert von Derntl, 2009

3.5.2 Herstellung eines Antiserums gegen NEP

Bisherige Bemühungen um die Herstellung eines entsprechenden Antikörpers scheiterten, da das Protein nicht in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden konnte. Für die gegenständliche Expression und Aufreinigung wurde das Plasmid pQE-C-term-prt in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Von diesem Plasmid wird nicht das vollständige Protein exprimiert, sondern dessen C-Terminus mit His-Tag. Die Expression und Aufreinigung erfolgte nach den Angaben in Abschnitt 2.2.5.1.

Wie schon von früheren Aufreinigungsversuchen bekannt, gelang die Aufreinigung zunächst nicht in genügender Reinheit. Es zeigten sich zusätzliche Banden, welche vermutlich von einem Protein mit natürlichem His-Tag herrührten. Da auf den Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen (Abschnitt 2.2.5.2) im Durchfluss noch viel exprimiertes Protein zu erkennen war, wurde dieser mehrmals hintereinander mit Ni-NTA versetzt. Dies führte dazu, dass die Verunreinigung, die offenbar eine höhere Affinität zur Ni-NTA besaß als das aufzureinigende Protein, mit jeder Elution abnahm. Nach der vierten Ni-NTA-Zugabe war die Verunreinigung in den eluierten Fraktionen vernachlässigbar, das Protein hingegen in ausreichender Menge und Reinheit vorhanden (siehe Abbildung 17, A und B).

Ergebnisse und Diskussion

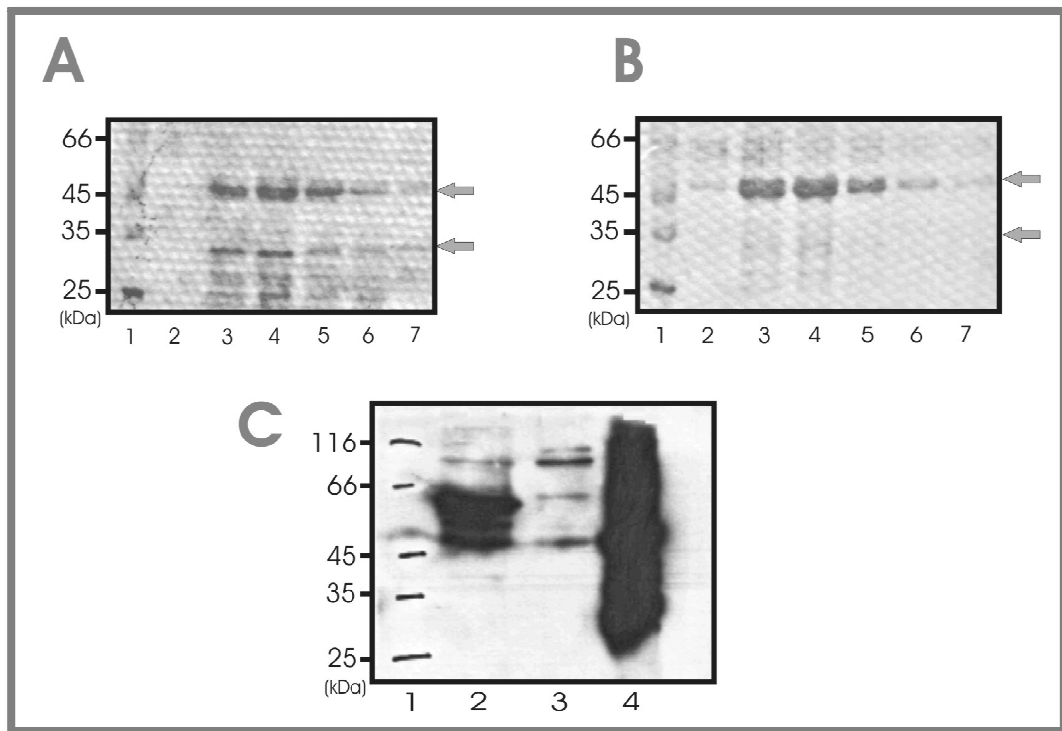


Abbildung 17: Antikörper gegen NEP

A zeigt die eluierten Fraktionen des exprimierten C-Terminus der NEP nach der zweiten Ni-NTA-Zugabe. Zwar ist das gewünschte Protein vorhanden (Bande bei 45 kDa, oberer Pfeil), jedoch gibt es eine deutlich sichtbare Verunreinigung (Bande bei 30 kDa, unterer Pfeil). Ab der vierten Ni-NTA-Zugabe ist diese Verunreinigung nicht mehr nachzuweisen. Exemplarisch für die Aufreinigungen vier bis neun sind in B die eluierten Fraktionen nach der sechsten Ni-NTA-Zugabe dargestellt. Der C-Terminus der NEP (Bande bei 45 kDa, oberer Pfeil) ist besonders in den Spuren 3 und 4 hoch konzentriert, die Verunreinigung (zuvor bei 30 kDa, unterer Pfeil) fehlt.

C zeigt einen Western Blot, mit dem das erhaltene Antiserum überprüft wurde. In Spur 2 befindet sich eine Probe von *Nab. magadii* L13, in Spur 3 *Nab. magadii* P3 als Negativkontrolle und in Spur 4 der zuvor aufgereinigte C-Terminus der NEP als Positivkontrolle. Die Proben der Spuren 2 und 3 wurden aus Kulturen in der stationären Phase gezogen und nach Abschnitt 2.2.1.3 vorbereitet. Die Verdünnung des Antiserums betrug 1:2500 in 1x TBS mit 0,3 % BSA, jene des sekundären Antikörpers α -rabbit (HRP) 1:5000 in 1x TBS.

Grafik und Text selbst erstellt

Das erhaltene Antiserum wurde hinsichtlich der Erkennung der Protease und der dafür einzusetzenden Konzentration überprüft. Für diese Western Blots wurden folgende Proben aufgetragen: je eine Probe von *Nab. magadii* L13 und *Nab. magadii* P3 sowie vom verdünnten aufgereinigten Protein, welches zur Antikörperproduktion verwendet wurde. Die beiden Proben

Ergebnisse und Diskussion

aus *Nab. magadii* L13 und *Nab. magadii* P3 wurden jeweils in der stationären Phase gezogen und wie in Abschnitt 2.2.1.3 angegeben vorbereitet. Das aufgereinigte Protein wurde etwa 1:100 mit 1x PBS verdünnt. Für jeden Western Blot wurden von jeder Probe 10 µl aufgetragen. Das aufgereinigte Protein sowie die Proteinprobe aus *Nab. magadii* L13 dienten als Positiv-, die Proteinprobe aus *Nab. magadii* P3 als Negativkontrolle. Die Verdünnung des Antiserums betrug 1:2500 in 1x TBS mit 0,3 % BSA, jene des sekundären Antikörpers α -rabbit (HRP) 1:5000 in 1x TBS.

Abbildung 17C zeigt den resultierenden Western Blot. Da es sich bei dem aufgereinigten Protein um den C-Terminus der Protease handelte, befinden sich die Banden der beiden Positivkontrollen auf unterschiedlichen Höhen. Das Ausbleiben eines Signals in Spur 3 (Negativkontrolle) in Kombination mit den Banden in den Spuren 2 und 4 (Positivkontrollen aus *Nab. magadii* L13 bzw. aufgereinigtem Protein) führt zu dem Schluss, dass die NEP durch die im Serum enthaltenen Antikörper spezifisch erkannt wird. Das Antiserum kann in der Verdünnung 1:5000 in 1x TBS mit 0,3 % BSA eingesetzt werden.

3.5.3 Vergleich der NEP-Expression in mehreren Stämmen

Wie in Abschnitt 3.5.1 erläutert, soll die NEP-Expression in den Stämmen *Nab. magadii* L13, *Nab. magadii* P3 sowie im mittels Plasmid komplementierten Stamm *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) hinsichtlich deren Beginn und Menge untersucht werden. Hierfür wird eine Zeitreihe mit den genannten Stämmen durchgeführt. Um gegebenenfalls Effekte durch das Plasmid pNB102 berücksichtigen zu können, werden zusätzlich die Stämme *Nab. magadii* L13 (pNB102) und P3 (pNB102) für die Zeitreihe verwendet. Die letzteren beiden sowie *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) wurden mittels PCR auf das beinhaltete Plasmid getestet (Primer NB-1 und NB-2, Daten nicht angeführt). Ebenso wurden alle verwendeten *Nab. magadii* P3-Stämme auf Vorhandensein der Deletion kontrolliert, bzw. wurde der komplementierte Stamm zusätzlich auf eine – unerwünschte – Re-Integration überprüft. Die Kontroll-PCRs wurden nach den Angaben in der Diplomarbeit von Christian Derntl (2009, Abschnitt 3.1.5) durchgeführt. Alle PCRs bestätigten die erwarteten Genotypen der verwendeten Kulturen (Daten nicht angeführt).

Ergebnisse und Diskussion

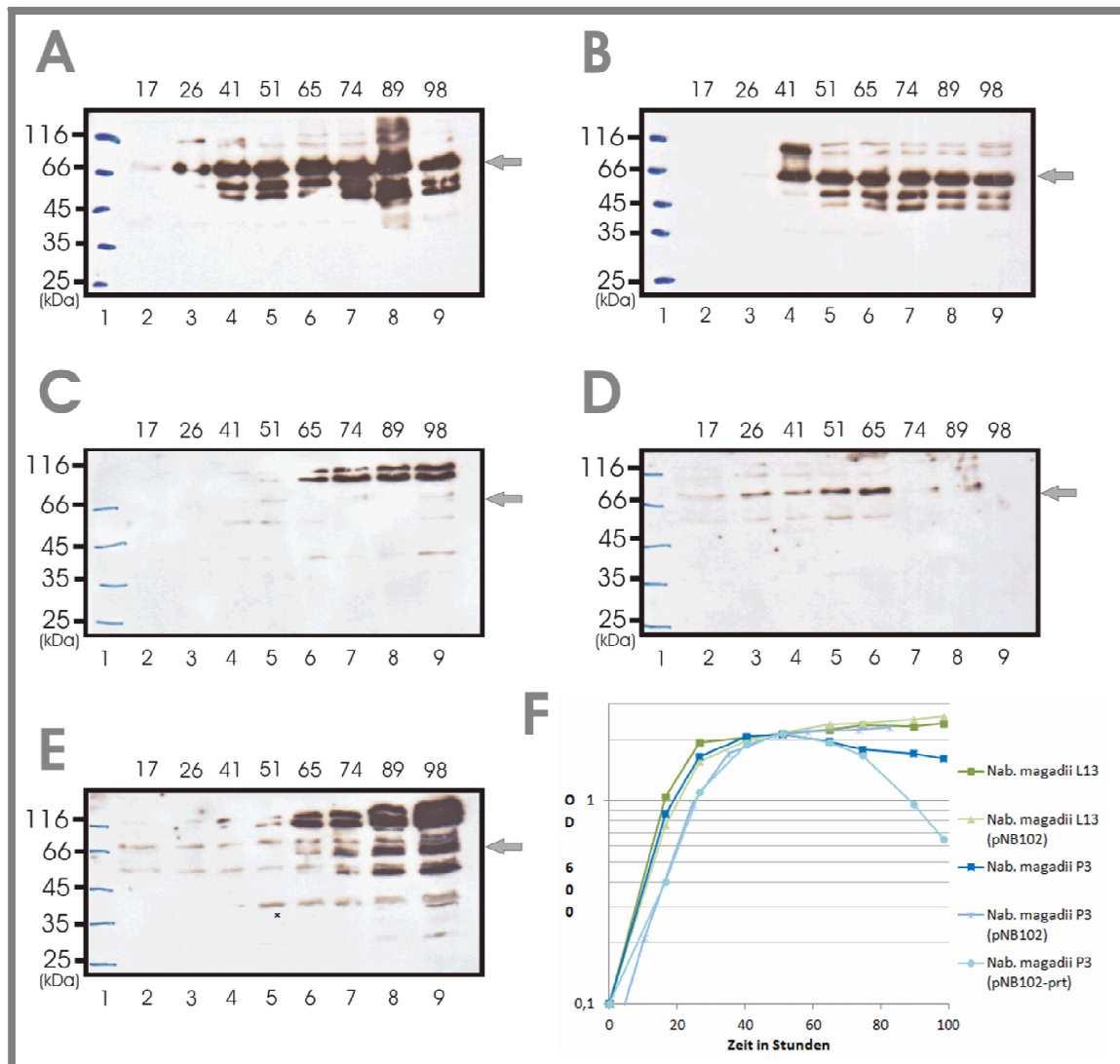


Abbildung 18: Western Blots zum Nachweis der NEP-Expression in verschiedenen Kulturen

Bei allen Grafiken ist die Höhe des erwarteten Signals durch einen Pfeil angezeigt, die Zahlen oberhalb der Spuren bezeichnen den Probenahmezeitpunkt. Die zugehörigen Wachstumskurven aller Stämme können der Grafik F entnommen werden.

Grafik A zeigt den Western Blot zum Nachweis der NEP des Stammes *Nab. magadii* L13, Grafik B den des Stammes *Nab. magadii* L13 (pNB102). Darunter sind in den Grafiken C und D die Western Blots der Stämme *Nab. magadii* P3 und *Nab. magadii* P3 (pNB102) zu sehen. In Grafik F findet sich der Blot von *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt).

Grafik und Text selbst erstellt

Die Kulturen wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 in Erlenmeyerkolben inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die hierzu verwendeten Vorkulturen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ < 0,6). Da die Expression der NEP erst gegen Ende der logarithmischen

Ergebnisse und Diskussion

Phase einsetzt (siehe Abschnitt 1.2.1), wurde durch diese Vorgehensweise sichergestellt, dass die in den Western Blots nachgewiesene NEP nicht aus den jeweiligen Vorkulturen stammte. Zweimal täglich wurde die Dichte der Kulturen bestimmt, eine Probe gezogen (Abschnitt 2.2.1.3) und diese mittels Western Blot analysiert (Abschnitt 2.2.5.3). Der primäre Antikörper α -NEP wurde 1:5000 in 1x TBS mit 0,3 % BSA eingesetzt.

Die Abbildung 18 stellt die Ergebnisse dieser Western Blots dar. Etwa 26 Stunden nach Inokulation ist bereits das Ende des logarithmischen Wachstums bei allen Kulturen zu erkennen (Grafik F). Nach diesem Zeitpunkt ist in *Nab. magadii* L13 (Grafik A) und *Nab. magadii* L13 (pNB102) (Grafik B) die Expression der NEP deutlich zu erkennen. In den Kulturen *Nab. magadii* P3 (Grafik C) und *Nab. magadii* P3 (pNB102) (Grafik D) hingegen können zu den entsprechenden Zeitpunkten keine nennenswerten Mengen der Protease nachgewiesen werden. Bei der Kultur *Nab. magadii* P3 (pNB102-pr) beobachtet man das Auftreten einer entsprechenden Bande während der gesamten Zeitreihe (Grafik E). Es muss angemerkt werden, dass die Wachstumskurve von *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) nicht den erwarteten Verlauf aufweist. Vergleicht man diesen in Grafik F mit den anderen, ist der deutliche Rückgang der Dichte der Kultur klar erkennbar.

3.5.4 Diskussion

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann keine Aussage über die Expression der NEP im komplementierten Stamm *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) getroffen werden. Der Verlauf der Wachstumskurve (Abbildung 18, Grafik F) deutet auf eine Infektion der Kultur mit dem Phagen ϕ Ch1 hin. Zudem legt das Bandenmuster, welches der Blot in Abbildung 18, Grafik E zeigt, den Schluss nahe, dass es in der Kultur zu genetischen Veränderungen gekommen sein könnte. Um dies mit Sicherheit auszuschließen, soll der Stamm *Nab. magadii* P3 erneut mit dem Plasmid pNB102-prt komplementiert werden. Im Anschluss kann das beschriebene Experiment erneut durchgeführt werden, um Klarheit bezüglich der Ursachen des vergrößerten Halos der komplementierten Mutante zu schaffen.

3.6 ORF93

3.6.1 Ausgangssituation

Nach heutigem Wissensstand zeigen Holine nicht gerade viele Gemeinsamkeiten, abgesehen von ihrer Funktion. Dies erschwert die Vorhersage der Funktion bzw. die Suche nach hierfür codierenden ORFs. Der ORF93 von ϕ Ch1 weist zwei bekannte Merkmale eines Holins auf. Er besitzt sowohl ein duales Startmotiv als auch Transmembrandomänen, zu sehen in Abbildung 19 (Klein *et al.*, 2002).

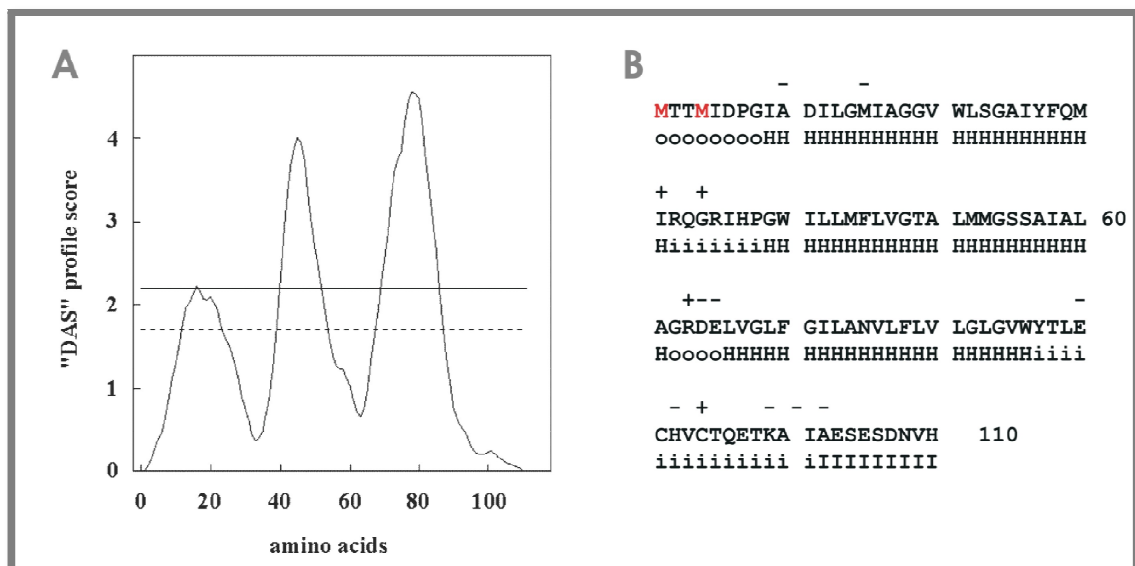


Abbildung 19: ORF93 zeigt Merkmale eines Holins

A: DAS steht für Dense Alignment Surface und stellt eine Vorhersagemethode für Proteinstrukturen dar. In der Analyse der ORF93 werden nach dieser Methode zwei bzw. drei Transmembrandomänen angegeben, je nachdem ob ein strikter (durchgezogene Linie) oder ein lockerer (gestrichelte Linie) Cutoff vorgenommen wird.

B: Diese Abbildung zeigt den ORF93 in einer anderen Darstellungsweise. Unterhalb der Aminosäuresequenz sind jene Bereiche, die Motive einer Helix zeigen, mit H markiert. Es ergeben sich drei Helices, welche eine typische Struktur für die Einlagerung in Membranen darstellen. Das duale Startmotiv ist am Anfang der Sequenz in Rot zu sehen.

Grafik und Text von Labor Angela Witte

Ergebnisse und Diskussion

Da von der Sequenz nicht mit Sicherheit auf die Funktion geschlossen werden kann, muss diese experimentell nachgewiesen werden. Um aber die Funktion eines Proteins zu testen, welches die Zelle lysiert, sobald es exprimiert wird, bedarf es eines induzierbaren, strikt kontrollierten Promotors. Ein solcher ist für *Nab. magadii* bislang nicht bekannt.

Im halophilen *Archaeon Hfx. volcanii* wurde 2007 ein Promotor beschrieben, der die gesuchten Eigenschaften aufweist: Er ist durch Zugabe von Tryptophan induzierbar und strikt kontrolliert. Dabei handelt es sich um den Promotor einer Tryptophanase „tna“ (Large *et al.*, 2007). Es ist anzunehmen, dass, falls es ein verwandtes Enzym in *Nab. magadii* gibt, dieses einer ähnlichen Kontrolle unterliegt. Die Datenbanksuche nach einer Tryptophanase in *Nab. magadii* verlief erfolgreich: Sie ist an der Position „1970129-1971481F“ codiert, besteht aus 450 Aminosäuren und hat ein Gewicht von etwa 50 kDa (Halolex, 2011). Die Upstream-Sequenz (500 bp) wird unter der Bezeichnung „tnaN“ in dieser Arbeit auf ihre Funktion als induzierbarer Promotor hin überprüft. Weiters soll die Aktivität von tna und tnaN in *Nab. magadii* quantifiziert werden, weshalb die halophile β -Galaktosidase bgaH als Reportergen eingesetzt wird (Holmes und Dyall-Smith, 2000).

3.6.2 Quantifizierung der Promotoraktivität

Der Promotor tna erwies sich in *Hfx. volcanii* als induzierbar, wobei die besten Ergebnisse mit Zugabe von 4 mM Tryptophan erzielt wurden. Es war zunächst zu klären, inwiefern sich das Wachstum von *Nab. magadii* L13 bei Zugabe von Tryptophan, gelöst in 1M NaOH, verändert. Daher wurde der Stamm zunächst im definierten Medium NMMb⁺ kultiviert, um Effekte von eventuell noch in den Zellen vorhandenem Tryptophan ausschließen zu können. Dann wurde eine frische Kultur von *Nab. magadii* L13 in NMMb⁺ angesetzt und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 zu gleichen Teilen auf fünf Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Jeweils einer dieser Kolben wurde versetzt mit 1 mM, 2mM bzw. 4 mM Tryptophan. Einem wurde ebensoviel 1 M NaOH zugesetzt, wie der Zugabe von 4 mM Tryptophan entsprach. Der fünfte Kolben diente als Kontrolle, ihm wurde nichts zugesetzt. Anschließend wurde die Wachstumskurve aller Kulturen aufgenommen und verglichen. Gleichzeitig wurde auch eine Kultur *Nab. magadii* L13 in NVM⁺ mit dem gleichen Versuchsaufbau untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

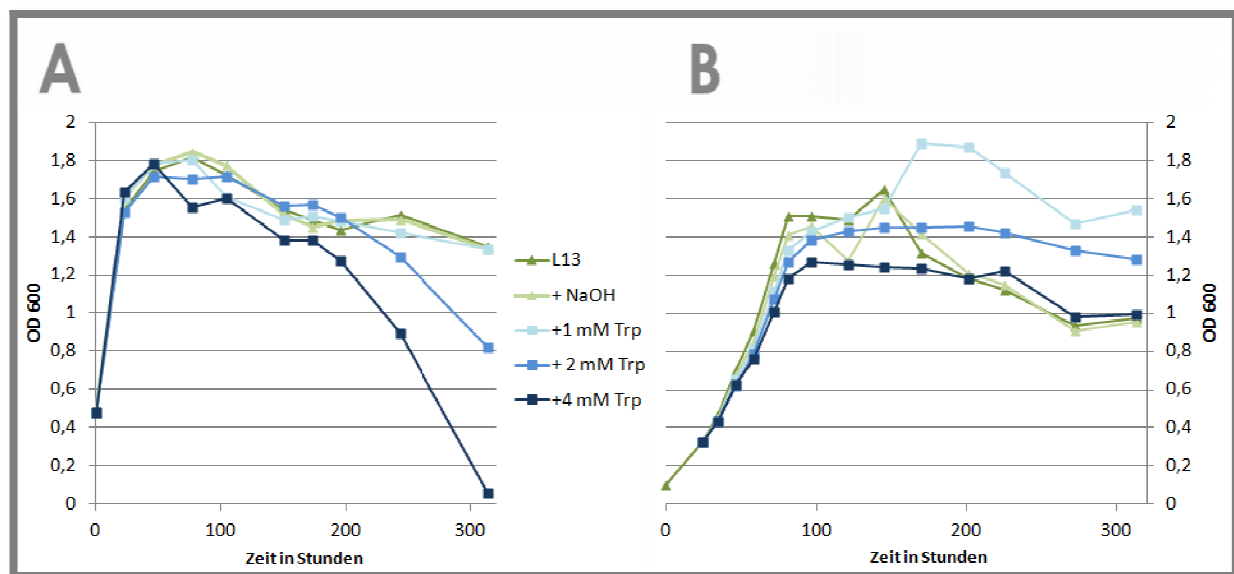


Abbildung 20: Wachstumskurven von *Nab. magadii* bei Zusatz von Tryptophan

Für beide Abbildungen gilt, dass die Kultur zunächst wachsen gelassen und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 auf insgesamt fünf Kolben aufgeteilt wurde. Drei Kolben wurde Tryptophan in der jeweils angegebene Konzentration zugesetzt, ein Kolben diente als Kontrolle (L13). Da das zugesetzte Tryptophan in 1 M NaOH gelöst war, wurde als weitere Kontrolle dem fünften Kolben so viel 1 M NaOH zugesetzt, wie der Zugabe von 4 mM Tryptophan entsprach. Dann wurde das Wachstum der Kulturen über 320 Stunden verfolgt.

A zeigt den Versuch mit *Nab. magadii* L13 in Natrialba Vollmedium. Jene Wachstumskurven, die unter B zu sehen sind, zeigen *Nab. magadii* L13 in NMMb⁺. Das letztere Medium wurde für die Untersuchung zur Charakterisierung der Promotoren *tna* und *tnaN* eingesetzt.

Grafik und Text selbst erstellt

In Abbildung 20 sieht man, dass die Zugabe von Tryptophan das Wachstum von *Nab. magadii* L13 sowohl im definierten als auch im Vollmedium beeinflusst. Da der Effekt direkt proportional zur eingesetzten Tryptophankonzentration ist und es im Vollmedium sogar zum Absterben der Kultur kommt, stellt die Verwendung von 2 mM Tryptophan den gangbaren Mittelweg zwischen effektiver Induktion und negativen Begleiterscheinungen dar.

Um die Aktivität der Promotoren *tna* und *tnaN* quantifizieren zu können, wurden die Plasmide pRo5-*tna*-bgaH und pRo5-*tnaN*-bgaH konstruiert (siehe Abschnitt 2.2.7.2 und 2.2.7.3) und in *Nab. magadii* L13 transformiert (siehe Abschnitte 2.2.2.1, 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Für die Quantifizierung werden die Kulturen 1 und 2 für *tna* und Kulturen 1, 4, 6, 7 und 9 für *tnaN*

Ergebnisse und Diskussion

ausgewählt, da diese jeweils positiv auf das Plasmid getestet wurden (Daten nicht angeführt). Zusätzlich wurde eine Kultur *Nab. magadii* L13 als Kontrolle mit dem gleichen Versuchsaufbau getestet, um verfälschte Werte aufgrund etwaiger unbekannter Enzyme zu erkennen und zu vermeiden. Jede Kultur wurde aus einer Vorkultur, welche sich im exponentiellen Wachstum befand, in NMMb⁺ mit OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei Erreichen einer Dichte von 0,3 zu gleichen Teilen in zwei kleinere Kolben aufgeteilt. Einer der Kolben wurde mit 2 mM Tryptophan versetzt, der andere diente zur Quantifizierung der Hintergrundaktivität der Promotoren. Von jedem Kolben wurde zu den folgenden Zeitpunkten die optische Dichte gemessen, eine Probe von 1,5 ml entnommen und wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben vorbereitet: 2, 4, 6, 8, 23, 33, 47, 55, 72 und 95 Stunden nach Induktion. Die Messung mit anschließender Berechnung erfolgte nach Abschnitt 2.2.2.8, die vollständigen Ergebnisse finden sich in den Tabellen 1 und 2. Zur Veranschaulichung sind ausgewählte Ergebnisse außerdem in Abbildung 21 dargestellt.

Stunde ab Induktion	Kultur 1		Kultur 2		<i>Nab.magadii</i> L13	
	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert
0	-	-	-	-	-	-
2	7	106	7	23	6	5
4	6	141	5	37	3	5
6	6	197	5	58	5	4
8	5	221	7	82	3	5
23	5	412	3	126	2	-3
33	8	568	1	158	0	0
47	7	1789	3	480	14	17
55	13	1849	3	932	1	14
72	13	1080	4	958	1	9
95	8	460	4	777	2	-4

Tabelle 1: Berechnung der spezifischen Aktivität von bgaH nach Induktion des kontrollierenden Promotors tna aus *Hfx. volcanii*

Die angegebenen Werte zeigen die berechnete spezifische Aktivität der β -Galaktosidase zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine Darstellung ausgewählter Werte findet sich in Abbildung 21.

Ergebnisse und Diskussion

Stunde ab Induktion	Kultur 1		Kultur 4		Kultur 6		Kultur 7		Kultur 9		Nab. magadii L13	
	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert	Kontrolle	Induziert
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	7	66	13	98	8	116	3	11	5	113	6	5
4	4	94	7	152	8	140	7	17	5	115	3	5
6	9	159	9	266	10	212	4	25	9	174	5	4
8	5	209	22	346	7	307	4	0	8	234	3	5
23	6	328	8	555	8	467	0	64	6	444	2	-3
33	6	395	8	619	10	661	5	100	8	512	0	0
47	9	1309	12	2111	8	2034	2	378	19	1571	14	17
55	8	2054	13	2804	10	2957	2	590	14	2254	1	14
72	8	1559	12	3004	14	3260	2	661	11	2260	1	9
95	6	631	7	910	9	1748	7	478	8	2358	2	-4

Tabelle 2: Berechnung der spezifischen Aktivität von bgaH nach Induktion des kontrollierenden Promotors tnaN aus *Nab. magadii*

Die angegebenen Werte zeigen die berechnete spezifische Aktivität der β -Galaktosidase zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine grafische Darstellung ausgewählter Werte aus dieser Tabelle findet sich in Abbildung 21.

Ergebnisse und Diskussion

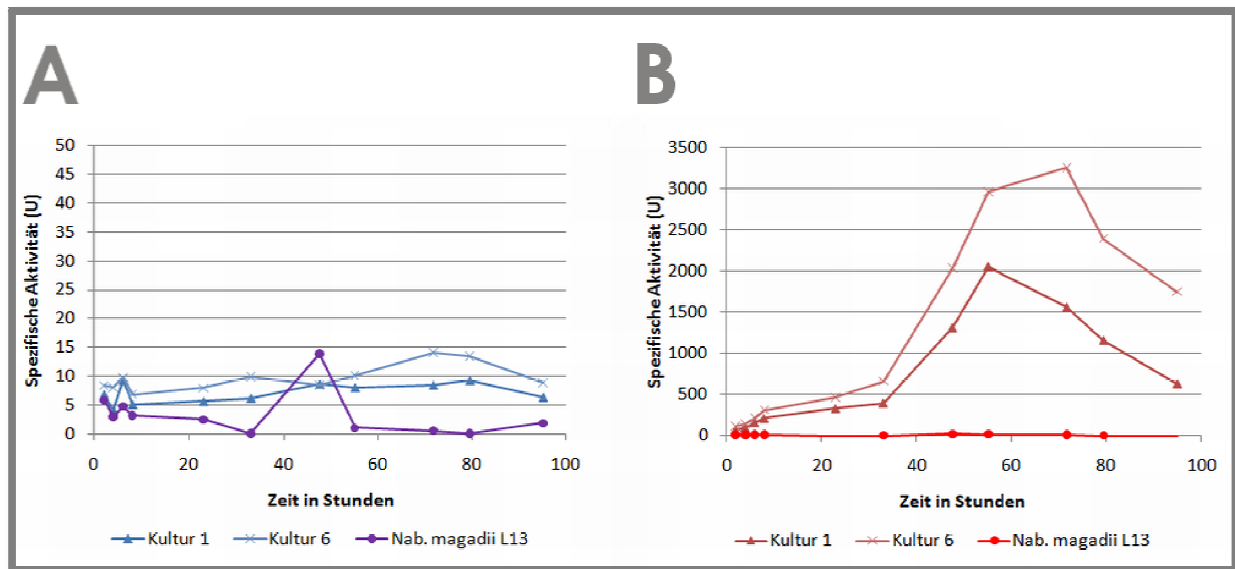


Abbildung 21: Verlauf der spezifischen Aktivität der β -Galaktosidase nach Induktion des kontrollierenden Promotors tnaN

Die Grafik A zeigt die spezifische Aktivität in den Kontrollkulturen. Diese wurden nicht induziert, das heißt es erfolgte keine Zugabe von Tryptophan. In Grafik B ist der Verlauf der spezifischen Aktivität der β -Galaktosidase in den induzierten Kulturen dargestellt. Etwa 60 Stunden nach der Induktion erreichten alle Kulturen ihren Maximalwert. Ausgenommen hiervon ist die Kultur *Nab. magadii* L13, die keine nennenswerte Veränderung aufwies.

Für beide Grafiken gilt: T=0 ist der Zeitpunkt der Induktion.

Grafik und Text selbst erstellt

Die Untersuchungsergebnisse von tna und tnaN erweisen sich als annähernd ident. Beide Promotoren sind in *Nab. magadii* L13 durch Zugabe von Tryptophan induzierbar und zeigen kaum Hintergrundaktivität. Bereits 2 Stunden nach Induktion kann die Expression des Reportergens nachgewiesen werden. Das Maximum der Aktivität wird etwa 60 Stunden nach der Induktion erreicht. Das mittlere Maximum der spezifischen Aktivität von tnaN beträgt 2274 U, jenes von tna 1404 U.

Sowohl für tna als auch tnaN gilt, dass keine nennenswerte Hintergrundaktivität festgestellt wurde. Allerdings kann die Frage, ob tatsächlich strikte Kontrolle des Reportergens vorliegt, in dieser Arbeit nicht beantwortet werden, da sich die Aktivitäten der nicht-induzierten Kontrollkulturen an der unteren Nachweisgrenze der Methode bewegen. Somit kann nur der Größenordnung der berechneten Aktivität, nicht aber deren exaktem Zahlenwert Aussagekraft beigemessen werden. Dieser wäre im Rahmen weiterer Untersuchungen mit einer alternativen Methode zu analysieren.

Ergebnisse und Diskussion

3.6.3 Analyse der Funktion der ORF93

Um die Funktion des gp93 als Holin zu überprüfen, wurde zunächst das Plasmid pRo5-tnaN-ORF93 konstruiert. Die Klonierungsstrategie kann im Abschnitt 2.2.7.4 nachvollzogen werden. Da die Expression des gp93 durch die Gegenwart von Tryptophan im Medium ausgelöst worden wäre, wurden alle Schritte im Medium NMMb⁺ durchgeführt. Das Plasmid wurde in *Nab. magadii* L13 transformiert (siehe Abschnitte 2.2.2.1, 2.2.2.3 und 2.2.2.4) und anschließend der Erfolg der Transformation mittels PCR mit den Primern 93-3-Kpn und 93-5-Nde überprüft (Abbildung 22 A). Als Positivkontrolle – zu sehen in Spur 15 – diente das transformierte Plasmid, als Negativkontrolle ein Template von *Nab. magadii* L13. Die Kulturen 7, 9, 10 und 11 wurden für die weitere Analyse ausgewählt.

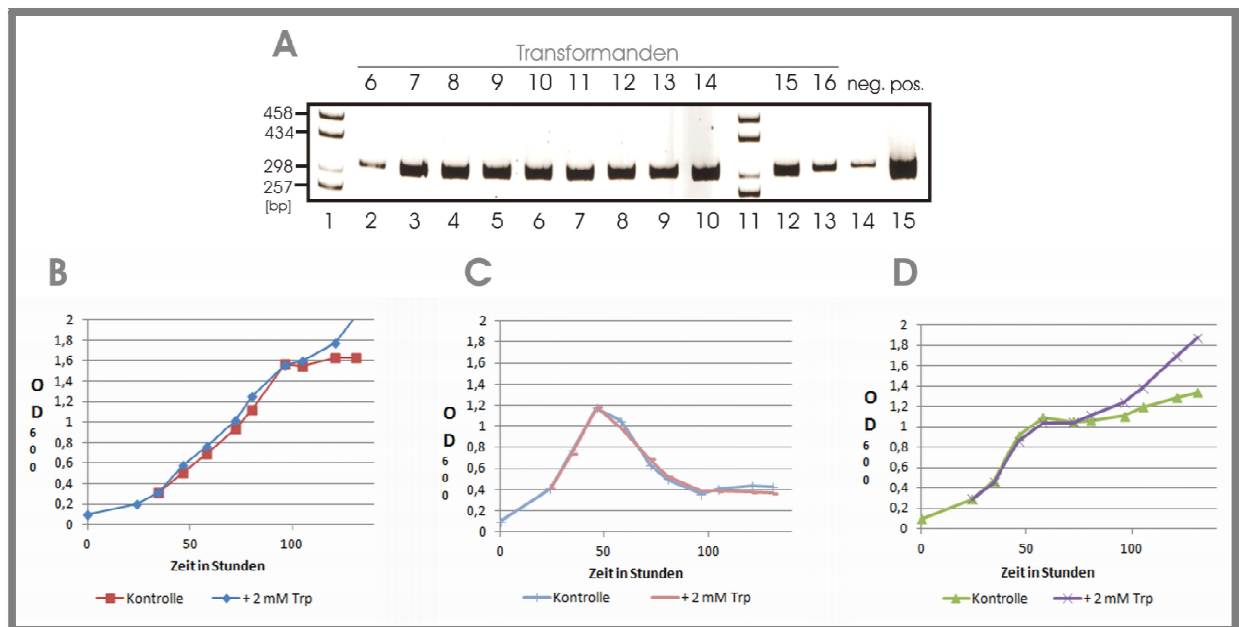


Abbildung 22: Induktion des Konstrukts pRo5-tnaN-ORF93 in mehreren Kulturen

Grafik A zeigt die Kontroll-PCR zur Bestätigung der positiven Transformanten (Plasmid pRo5-tnaN-ORF93 in *Nab. magadii* L13). Für die gewählten Primer 93-3-Kpn und 93-5-Nde diente ein Template von *Nab. magadii* L13 als Negativ-, das transformierte Plasmid als Positivkontrolle.

Die Grafiken B, C und D zeigen ausgewählte Wachstumskurven des Versuchs zur Expression des gp93. In Grafik B findet sich die Kontrollkultur *Nab. magadii* L13 ohne Plasmid, in Grafik C die Kultur 10 und in Grafik D die Kultur 7. Die letzteren beiden wurden positiv auf das Plasmid pRo5-tnaN-ORF93 getestet. Alle Kulturen wurden bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 geteilt, eine Hälfte mit 2 mM Tryptophan induziert und die Wachstumskurve aufgenommen. Die vollständigen Daten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Grafik und Text selbst erstellt

Ergebnisse und Diskussion

Zeit in Stunden	Kultur 7		Kultur 9		Kultur 10		Kultur 11		<i>Nab. magadii</i> L13	
	Kontrolle	+ 2mM Trp	Kontrolle	+ 2mM Trp	Kontrolle	+ 2mM Trp	Kontrolle	+ 2mM Trp	Kontrolle	+ 2mM Trp
0	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1	
24	0,296		0,312		0,412		0,312		0,204	
34,5	0,475	0,457	0,546	0,527	0,768	0,745	0,585	0,563	0,31	
46,5	0,915	0,865	1,03	1,035	1,175	1,185	1,37	1,335	0,575	0,505
58	1,095	1,045	1,01	1,05	1,05	0,98	1,13	1,11	0,76	0,69
72,25	1,055	1,045	0,935	1,02	0,635	0,69	1,185	1,175	1,02	0,94
80,5	1,065	1,115	0,945	1,07	0,5	0,525	1,27	1,285	1,25	1,12
96,5	1,11	1,245	0,93	1,145	0,358	0,391	1,255	1,495	1,56	1,57
105	1,195	1,385	0,965	1,195	0,407	0,385	1,025	1,615	1,595	1,545
121	1,29	1,695	0,975	1,535	0,435	0,375	0,765	1,98	1,775	1,625
131	1,34	1,88	0,995	1,715	0,425	0,365	0,635	2,165	2,035	1,63

Tabelle 3: Wachstumskurve von *Nab. magadii* L13 bei Expression des ORF93 unter Kontrolle des Promotors tnaN

Die positiv für das Konstrukt getesteten Transformanten 7, 9, 10 und 11 wurden ebenso wie *Nab. magadii* L13 mit OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei Erreichen der OD₆₀₀ von 0,3 auf zwei Kolben aufgeteilt. Einer der beiden Kolben wurde anschließend mit 2 mM Tryptophan Endkonzentration versetzt, um die Expression des gp93 zu induzieren. In weiterer Folge wurden die Wachstumskurven aller Kulturen aufgezeichnet. Ausgewählte Kurven sind in Abbildung 22 in den Grafiken B, C und D dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Im transformierten Plasmid pRo5-tnaN-ORF93 steht der ORF93 unter der Kontrolle des durch Zugabe von Tryptophan induzierbaren Promotors *tnaN*, dessen Aktivität bereits in Abschnitt 3.6.2 quantifiziert wurde. Um zu überprüfen, ob es sich bei gp93 tatsächlich um ein Holin handelt, wurde analog der Quantifizierung der Promotoraktivität vorgegangen. Die Kulturen 7, 9, 10 und 11 sowie eine Kultur *Nab. magadii* L13 wurden mit OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert, bei 37 °C schüttelnd inkubiert und bei Erreichen einer Dichte von 0,3 auf zwei Schikanekolben aufgeteilt, wobei einer mit 2 mM Tryptophan versetzt wurde. In weiterer Folge wurde morgens und abends die OD₆₀₀ aller Kulturen gemessen und der Verlauf der Wachstumskurven verglichen. Die Daten aller Wachstumskurven können Tabelle 3 entnommen werden, ausgewählte Kurven sind zusätzlich in Abbildung 22 B, C und D ersichtlich. Hierzu ist zu sagen, dass das Wachstum der Kulturen 9 und 11 weitgehend dem der in Grafik D (Abbildung 22) dargestellten Kultur 7 entsprach. Einzig die Kultur 10 (Grafik B) zeigte eine Reduktion der Dichte nach der Induktion des Promotors, wobei die nicht-induzierte Kontrollkultur den gleichen Verlauf aufweist. Zum Zeitpunkt der maximalen Promotoraktivität bei etwa 60 Stunden nach Induktion wurde aus allen Kulturen eine Proteinprobe nach Abschnitt 2.2.1.2 aufbereitet und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.2.5.2) analysiert (Daten nicht angeführt). Auf der berechneten Höhe des gp93 von 11,8 kDa zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Proben der induzierten und nicht-induzierten Kulturen, jedoch fiel bei den induzierten Kulturen eine zusätzliche Bande bei rund 66 kDa auf.

Der prognostizierte Phänotyp im Falle eines Holins, die Lyse der induzierten Kultur bei unverändertem Wachstum der nicht-induzierten Kultur, konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr scheint es, als habe die Zugabe von Tryptophan während der ersten 20 Stunden keinen Einfluss auf Leben oder Sterben der Kulturen, da die Kurven bei induzierter und nicht-induzierter Kultur parallel verlaufen. Erst etwa 70 Stunden nach Induktion zeigte sich bei den Kulturen 7, 9 und 11 ein Unterschied, wobei der induzierte Stamm dichter anwuchs als der nicht-induzierte.

Ergebnisse und Diskussion

3.6.4 Diskussion

Eine definitive Aussage, ob der ORF93 für ein Holin kodiert, kann mit den verfügbaren Daten nicht getroffen werden. Das Ausbleiben des erwarteten Phänotyps spricht zwar gegen die vermutete Funktion, dennoch ist dies kein Beweis. Es muss befürchtet werden, dass – sollte es sich wirklich um ein Holin handeln – von vornherein nur jene Kulturen anwuchsen, welche das Protein gar nicht oder aus unbekannten Gründen funktionsunfähig exprimierten. Zu Letzterem sei vermerkt, dass angenommen wird, Holine arbeiteten als Oligomere. Falls zu deren Formation Chaperone oder dergleichen benötigt werden, kann mit einem Experiment wie dem hier beschriebenen aufgrund der fehlenden Bildung des funktionsfähigen Komplexes keine Lyse ausgelöst werden.

Der Nachweis eines Holins scheint daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich. Zunächst sollte die Hintergrundaktivität der getesteten, induzierbaren Promotoren mit geeigneten Methoden quantifiziert werden, die noch zu identifizieren sind. Eventuell ist dies auch durch Maßnahmen zum Aufkonzentrieren der Probe zu bewerkstelligen, sodass die etablierte Methode, die Messung der BgaH-Aktivität, beibehalten werden kann. Jedoch war bereits in der dargestellten Mess-Serie mitunter eine hohe Grundabsorption durch Zellreste gegeben, was bei weiterer Aufkonzentrierung die photometrische Messung des Absorptionsverlaufs weiter beeinträchtigen könnte. Es ist zu prüfen, ob diesem Problem mit Abzentrifugieren der zur Messung vorbereiteten und bereits lysierten Zellen beizukommen ist.

Eine mögliche Erklärung für das später einsetzende, verstärkte Wachstum der induzierten Kulturen bietet die Tryptophanase aus *Nab. magadii* L13, deren induzierbarer Promotor für die Analyse des ORF93 verwendet wurde. Mit der Zugabe von Tryptophan wurde vermutlich auch die Expression der Tryptophanase induziert. Es darf angenommen werden, dass die zusätzliche Bande in den SDS-PAGE-Gelen auf einer Höhe von etwa 66 kDa auf ebendieses Protein zurückzuführen ist. Das Gewicht der Tryptophanase wurde mit etwa 50 kDa berechnet, jedoch führt der saure isoelektrische Punkt von 4,5 zu einem vermeintlich höheren Gewicht bei Analysen mittels SDS-PAGE. Da die Funktion einer Tryptophanase darin besteht, Tryptophan als Energiequelle verwertbar zu machen, ergäbe sich außerdem ein Vorteil der induzierten

Ergebnisse und Diskussion

Kulturen gegenüber den nicht-induzierten, was das später wieder einsetzende Wachstum zu erklären vermag. Dafür spricht im Übrigen, dass das erneute Anwachsen rund 70 Stunden nach der Zugabe von Tryptophan erfolgte, was in etwa dem Zeitpunkt der berechneten Maximalaktivität des Promotors *tnaN* entspricht.

Bislang nicht erklärbar ist der parallele Verlauf der Wachstumskurven von induzierten und nicht induzierten Kulturen bis etwa 70 Stunden nach der Induktion. Denkbar wäre hier ein Effekt durch das eingebrachte Plasmid oder eine Beeinträchtigung durch das verwendete Antibiotikum Novobiocin. Beides hätte keinen Einfluss auf die Kontrollkultur *Nab. magadii* L13 und könnte Unterschiede zu dieser erklären. Um derartige Effekte zu berücksichtigen, soll bei einer zweifelsohne notwendigen Wiederholung des Experiments ebenfalls *Nab. magadii* L13 (pRo-5) als Kontrollkultur eingesetzt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist das Experiment außerdem mit jenen Kulturen durchzuführen, die das Plasmid pRo5-tna-ORF93 tragen.

Mit den Promotoren *tna* und *tnaN* steht nun ein Überexpressionssystem für *Nab. magadii* zur Verfügung. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet sind jedoch noch nicht abgeschlossen. Wie bereits diskutiert, bleibt die Frage zu klären, ob es sich um strikt kontrollierte Promotoren handelt, und falls nicht, welchen Wert die Hintergrundaktivität aufweist. Die unterschiedlichen Aktivitäten in den einzelnen transformierten Kulturen erschweren die Quantifizierung der Promotoraktivität erheblich. Um einen verlässlichen Wert zu erhalten, werden die beschriebenen Zeitreihen mehrfach durchzuführen zu sein. Weiters stellt sich die Frage nach Aktivität und Induzierbarkeit in Vollmedium, also bei Präsenz von Tryptophan im Medium. Nicht zuletzt sollten die Promotoren *tna* und *tnaN* auf ihre Funktion in anderen Stämmen wie zum Beispiel *Natrialba asiatica* hin untersucht werden.

Referenzen

4 Referenzen

Allers, T. und Mevarech, M. (2005) Archaeal genetics – the third way. *Nature Reviews Genetics* **6**: 58-73

Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. und Pace, N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **93**: 9188-93

Baranyi, U., Klein, R., Lubitz, W., Krüger, D.H. und Witte, A. (2000) The archaeal halophilic virus encoded dam-like methyltransferase M.φCh1-I methylates adenine residues and complements dam mutants in the low salt environment of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **35**: 1168-79

Barry, E.R. und Bell, S.D. (2006) 'DNA replication in the Archaea', *Microbiology and molecular biology reviews* **70**: 876-87

Bath, C. und Dyall-Smith, M.L. (1998) His1, an archaeal virus of the *Fuselloviridae* family that infects *Haloarcula hispanica*. *Journal of Virology* **72**: 9392-5

Bell, S.D, Jackson, S.P. (1998) Transcription and translation in *Archaea*: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology* **6**:222-8

Bonneté, F., Madern, D., Zaccai, G. (1994) 'Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions', *Journal of Molecular Biology* **244**:436-47.

Brown, AD. (1990) Microbial Water Stress Physiology. Principles and Perspectives. Chichester: John Wiley & Sons;

Brown, J.R., Doolittle, W.F. (1997) *Archaea* and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **61**: 456-502

Calmettes, P., Eisenberg, H., Zaccai, G. (1987) 'Structure of halophilic malate dehydrogenase in multimolar KCl solutions from neutron scattering and ultracentrifugation', *Biophysical Chemistry* **26**:279-90

Chaban B, Ng SY, Jarrell KF. (2006) Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* **52**:73-116.

Referenzen

Clokier, MR., Millard, AD., Letarov, AV., Heaphy, S. (2011) Phages in nature., *Bacteriophage*. **1**:31-45.

Derntl, C. (2009) Construction of the first deletion mutant of a haloalkaliphilic archaeon and analysis of gene expression of the methyltransferase M.Nma ϕ Ch1I of the halophage ϕ Ch1. *Diploma thesis, University of Vienna*

Dyall-Smith, M. (2009) The Halohandbook - protocols for haloarchaeal genetics (version 7).
http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/Halohandbook_2008_v7.pdf.

Dyall-Smith, M., Tang, S.-L. und Bath, C. (2003) Haloarchaeal viruses: how diverse are they? *Research in Microbiology* **154**: 309-13

Fermentas (2011) <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>; abgerufen zwischen Sept. 2011 und Aug. 2011

Forterre, P., Brochier, C. und Philippe, H. (2002) Evolution of the *Archaea*. *Theoretical Population Biology* **61**: 409-22

Giménez, MI., Studdert, CA., Sánchez, JJ., De Castro, RE. (2000) Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles* **4**:181-8

Gribaldo, S. und Brochier-Armanet, C (2006) The origin and evolution of *Archaea*: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 1007-22

Gropp, F., Pal, P., und Zillig, W. (1989) Expression and regulation of *Halobacterium halobium* phage ϕ H genes. *Canadian Journal of Microbiology* **35**:182-8.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson M.J., Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* **177**: 4121-30

Halolex (2011): <http://www.halolex.mpg.de>; abgerufen im August 2011

Häring, M., Rachel, R., Peng, X., Garrett, R. und Pragishvili, D. (2005a) Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, *Acidianus* bottle-shaped virus, from a new family, the *Ampullaviridae*. *Journal of Virology* **79**: 9904-11

Referenzen

Häring, M., Vestergaard, G., Rachel, R., Lanming, C. und Prangishvili, D. (2005b) Independent virus development outside a host *Nature* **436**: 1101-2

Holmes, M.L. und Dyll-Smith, M.L. (1991) Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* **173**: 642-8

Holmes, M.L., Dyll-Smith, M.L. (2000) Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Molecular Microbiology* **36**:114-22

Holmes, M., Nuttall, S. und Dyll-Smith, M. (1991) Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *Journal of Bacteriology* **173**: 3807-13

Horikoshi, K. (1999) Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 735-50

Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. und Stetter, K.O. (2002) A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-7

Huber, H., Hohn, M.J., Stetter, K.O., Rachel, R. (2003) The phylum *Nanoarchaeota*: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in Microbiology* **154**: 165-71

ISCP (2011): <http://www.the-icsp.org>; abgerufen am 5. 10. 2011

Iro, M., Klein, R., Gálos, B., Baranyi, U., Rössler, N., Witte, A. (2007) The lysogenic region of virus ϕ Ch1: identification of a repressor-operator system and determination of its activity in halophilic *Archaea*. *Extremophiles* **11**: 383-96

Iro, M., Ladurner, A., Meissner, C., Derntl, C., Reiter, M., Haider, F., Rössler, N., Klein, R., Baranyi, U., H, S. und Witte, A. (in Vorbereitung.) Transformation of *Natrialba magadii*: application of ϕ Ch1 elements for a shuttle vector system for haloalkaliphilic *Archaea*

Jarrell, K.F. und McBride, M.J. (2008) 'The surprisingly diverse ways that prokaryotes move', *Nature Review Microbiology* **6**:466-76.

Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W. und Owenson, G.G. (1998) Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* **2**: 191-200

Referenzen

- Kamekura, M., Dyll-Smith, M.L., Upasani, V., Ventosa, A., Kates, M. (1997) Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., Respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 853-7
- Kandler, O. und König, H. (1998) Cell wall polymers in *Archaea* (archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Science* **54**: 305-8
- Karner, MB., DeLong, EF., Karl, DM. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**: 507-10
- Keeling, PJ., Charlebois, RL., Doolittle, WF. (1994) Archaeobacterial genomes: eubacterial form and eukaryotic content. *Current Opinion in genetics and development* **4**:816-822
- Klein, R., Baranyi, U., Rössler, N., Greineder, B., Scholz, H. und Witte, A. (2002) *Natrialba magadii* virus ϕ Ch1: first complete nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkaliphilic archaeon. *Molecular Microbiology* **45**:851-63
- Klein, R., Greineder, B., Baranyi, U. und Witte, A. (2000) The structural protein E of the archaeal virus ϕ Ch1: evidence for processing in *Natrialba magadii* during virus maturation. *Virology* **276**: 376-87
- Kushner, DJ. (1978) Life in high salt and solute concentrations; In: Kushner DJ,editor. Microbial Life in Extreme Environments. London: Academic Press. p 317-368.
- Lam, W.L. und Doolittle, W.F. (1992) Mevinolin-resistant mutations identify a promoter and the gene for a eukaryote-like 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 5829-34
- Lanyi, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic *Bacteria*. *Bacteriological Reviews* **38**: 272-90
- Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., Soppa, J., Lund, PA. (2007) Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Molecular Microbiology* **66**:1092-1106

Referenzen

Ma, Y., Galinski, EA., Grant, WD., Oren, A., Ventosa, A. (2010) 'Halophiles 2010: life in saline environments', *Applied and Environmental Microbiology* **76**:6971-81.

Madern, D., Pfister, C., Zaccai, G. (1995) A single acidic amino acid mutation enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *European journal of biochemistry* **30**: 1088-95

NASA 2003, http://nai.arc.nasa.gov/news_stories/news_detail.cfm?ID=274

Abgerufen am 7. 10. 2011

Olsen, G.J. (1994) *Archaea, Archaea, everywhere*. *Nature* **371**: 657-8

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**: 56-63

Oren, A. (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4(2)**

Oren, A., Bratbak, G., Haldal, M. (1997) Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles* **1**: 143-9

Pietilä, M.K., Roine, E., Paulin, L., Kalkkinen, N. und Bamford, D.H. (2009) 'An ssDNA virus infecting *Archaea*: a new lineage of viruses', *Molecular Microbiology* **72**:307-19.

Prangishvili, D., Forterre, P. und Garrett, R.A. (2006) Viruses of the *Archaea*: a unifying view. *Nature* **4**: 837-48

Pundak, S. und Eisenberg, H. (1981) Structure and activity of malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacteria of the Dead Sea. 2. Inactivation, dissociation and unfolding at NaCl concentrations below 2 M. Salt, salt concentration and temperature dependence of enzyme stability. *European Journal of Biochemistry* **118**:471-7

Reeve, J.N., Sandman, K., und Daniels C.J. (1997) Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell* **89**:999-102

Reiter, M. (2010) 'Gene regulation of ϕ Ch1: characterization of ORF49 and further characterization of the origin of replication of the halophage ϕ Ch1', *Diploma thesis, University of Vienna*

Referenzen

- Rössler, N., Klein, R., Scholz, H., Witte, A. (2004) Inversion within the haloalkaliphilic virus ϕ Ch1 DNA results in differential expression of structural proteins. *Molecular Microbiology* **52**: 413-26
- Rössler, N., Kögl, K., Hofstätter, H., Iro, M., Scholz, H., Klein, R. und A. Witte (in prep) ORF34 encodes the tail fibre protein of virus ϕ Ch1.
- Rothschild, L.J. und Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-101
- Schnabel, H., Zillig, W., Pfaißle, M., Schnabel, R., Michel, H. und Delius, H. (1982) *Halobacterium halobium* phage ϕ H. *EMBO Journal* **1**: 87-92
- Selb, R. (2010) Construction of mutants of *Natrialba magadii* und ϕ Ch1. *Diploma thesis, University of Vienna*
- Serganova, I., Ksenzenko, V., Serganov, A., Meshcheryakova, I., Pyatibratov, M., Vakhrusheva, O., Metlina, A. und Fedorov, O. (2002) Sequencing of flagellin genes from *Natrialba magadii* provides new insight into evolutionary aspects of archaeal flagellins. *Journal of Bacteriology* **184**:318-22.
- Siegel, P.J. und Schaechter, M. (1973) The role of the host cell membrane in the replication and morphogenesis of bacteriophages. *Annual Review Microbiology* **27**:261-82.
- Sleytr, UB. (1978) 'Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: Structure, chemistry, assembly, and function. *International Review of Cytology* **53**: 1-62
- Stolt, P., Zillig W. (1992) 'In vivo studies on the effects of immunity genes on early lytic transcription in the *Halobacterium salinarum* phage ϕ H', *Mol. Gen. Genet.* **235**:197-204.
- Thomas, N. A., Bardy, S. L. & Jarrell, K. F. (2001) The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 147–174
- Till, P. (2011) 'Deletion of the tail fibre protein of Φ Ch1 and further characterization of the inversion within its gene locus', *Diploma thesis, University of Vienna*
- Tindall, B., Ross, H. und Grant, W. (1984) *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaebacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **5**: 41-57

Referenzen

- van de Vossenberg, J.L.C.M., Driessen, A.J.M., Grant, D., Konings, W.N. (1999) Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic *Archaea* have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles* **3**: 253-7
- Wang, I.-N., Smith, D.L. und Young, R. (2000) Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review Microbiology* **54**:799-825.
- Wang, HY., Liu, DM., Liu, Y., Cheng, CF., Ma, QY., Huang, Q., Zhang, YZ. (2007) Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. *Letters in applied Microbiology* **44**:1-6
- Witte, A., Baranyi, U., Klein, R., Sulzner, M., Luo, C., Wanner, G., Krüger, D. und Lubitz, W. (1997) Characterization of *Natronobacterium magadii* phage ϕ Ch1, a unique archaeal phage containing DNA and RNA. *Molecular Microbiology* **23**: 603-16
- Woese, C.R. und Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **11**: 5088-90
- Woese, C.R., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **87**: 4576-9
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19
- Zhang, R. und Zhang, C.T. (2003) Multiple replication origins of the archaeon *Halobacterium* species NRC-1. *Biochemical and biophysical research communication* **302**: 728-34
- Zhou, M., Xiang, H., Sun, C. und Tan, H. (2004) Construction of a novel shuttle vector based on an RCR-plasmid from a haloalkaliphilic archaeon and transformation into other haloarchaea. *Biotechnology letters* **26**: 1107-13

Anhang

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum	12
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Nab. magadii</i>	18
Abbildung 3: Modell eines archaealen Flagellums	20
Abbildung 4: Morphologien von archaealen Viren	22
Abbildung 5: Morphologie von ϕ Ch1	23
Abbildung 6: Genom des Phagen ϕ Ch1	25
Abbildung 7: Verteilung der (mutanten) Chromosomen	62
Abbildung 8: Flagellin-Operon von <i>Nab. magadii</i>	64
Abbildung 9: Bestätigung von <i>Nab. magadii</i> L13- Δ fla	65
Abbildung 10: Kontroll-PCRs mehrerer Passagen von <i>Nab. magadii</i> L11- Δ E	66
Abbildung 11: Southern Blot <i>Nab. magadii</i> L11- Δ E	68
Abbildung 12: Kontroll-PCRs mehrerer Passagen von <i>Nab. magadii</i> L11- Δ E	69
Abbildung 13: Untersuchung von <i>Nab. magadii</i> L11- Δ E (Passage 25)	71
Abbildung 14: Wachstumskurven von <i>Nab. magadii</i> L11 und <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	73
Abbildung 15: Vergleich der Expressionsmuster <i>Nab. magadii</i> L11 und <i>Nab. magadii</i> L11- Δ ORF79	74
Abbildung 16: NEP-Aktivität mehrerer Stämme	80
Abbildung 17: Antikörper gegen NEP	81
Abbildung 18: Western Blots zum Nachweis der NEP-Expression in verschiedenen Kulturen	83
Abbildung 19: ORF 93 zeigt Merkmale eines Holins	85
Abbildung 20: Wachstumskurven von <i>Nab. magadii</i> bei Zusatz von Tryptophan	87
Abbildung 21: Verlauf der spezifischen Aktivität der β -Galaktosidase nach Induktion des kontrollierenden Promotors tnaN	90
Abbildung 22: Induktion des Konstrukts pRo5-tnaN-ORF93 in mehreren Kulturen	91

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung der spezifischen Aktivität von bgaH nach Induktion des kontrollierenden Promotors tna aus *Hfx. volcanii* _____ 88

Tabelle 2: Berechnung der spezifischen Aktivität von bgaH nach Induktion des kontrollierenden Promotors tnaN aus *Nab. magadii* _____ 89

Tabelle 3: Wachstumskurve von *Nab. magadii* L13 bei Expression des ORF93 unter Kontrolle des Promotors tnaN _____ 92

5.3 Zusammenfassung

Die Konstruktion einer Flagellum-Deletionsmutante von *Nab. magadii* sollte Licht in die Frage nach der Rolle des Flagellums bei der Adsorption des Phagen ϕ Ch1 an *Nab. magadii* bringen. Nach erfolgreicher Transformation des Konstrukts pKS_{II}⁺ (delta)flaB2::novR erwies sich dieses im Genom als derart instabil, dass es bislang nicht möglich war, eine homozygote Kultur zu erhalten, mit der man die gewünschten Untersuchungen hätte durchführen können.

Weiters wurden folgende bestehende *Nab. magadii*-Mutanten näher charakterisiert: *Nab. magadii* L11- Δ E, *Nab. magadii* L11- Δ ORF79, *Nab. magadii* P3. Bei Letzterer sollte die Expression der Natrialba Extrazellulären Protease (NEP) hinsichtlich Beginn und Menge im Vergleich zu den Stämmen *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) und *Nab. magadii* L13 untersucht werden. Das dafür hergestellte Antiserum erkennt die NEP. Der Vergleich der aufgenommenen Zeitreihen der genannten Stämme mittels Western Blot weist auf Veränderungen des Stamms *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) hin.

Für *Nab. magadii* L11- Δ E gilt unglücklicherweise Ähnliches wie für die Flagellum-Deletionsmutante: Zur Zeit der Übernahme war die Kultur heterozygot, daher sollte zunächst eine homozygote Kultur hergestellt werden. Trotz Bemühungen erwies sich die Kultur nach wie vor als heterozygot, was keine aussagekräftigen Experimente zuließ.

Die Genexpressionsmuster von *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 und dem Wildtyp *Nab. magadii* L11 wurden anhand von Western Blots verglichen. Tatsächlich fanden sich zahlreiche Unterschiede wie etwa früheres Auftreten der Hüllenproteine und eine Intervallverkürzung zwischen deren erstem Nachweis und dem Einsetzen der Lyse in *Nab. magadii* L11- Δ ORF79.

Als letztes Thema ist die Identifizierung des durch Zugabe von Tryptophan induzierbaren Promotors tnaN in *Nab. magadii* zu nennen. Dessen Aktivität wurde ebenso wie die des Promotors tna aus *Hfx. volcanii* in *Nab. magadii* quantifiziert. Anschließende Analysen zur Funktion eines möglichen Holins unter der Kontrolle dieser Promotoren ließen bislang keine eindeutigen Schlüsse zu.

Anhang

5.4 Abstract

The construction of flagellum deficient mutant of *Nab. magadii* was supposed to shed light in the role of the flagellum concerning the adsorption of the phage ϕ Ch1 on *Nab. magadii*. After successful transformation of the construct pKS_{II}⁺ (delta)flaB2::novR, it turned out to be unstable. Therefore it was not possible to receive a homozygous culture, with which the desired examination could have been performed.

Moreover, the following pre-existing mutants of *Nab. magadii* were further characterized: *Nab. magadii* L11- Δ E, *Nab. magadii* L11- Δ ORF79, *Nab. magadii* P3. Within the latter, the expression of the Natrialba Extracellular Protease (NEP) should be analyzed with regard to start of expression and expressed amount in contrast to the strains *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt) and *Nab. magadii* L13. The antiserum produced for this purpose detects the NEP. Comparing the Western Blots resulting from time course experiments, one has to presume that some changes occurred in *Nab. magadii* P3 (pNB102-prt).

Unfortunately, similar is true for *Nab. magadii* L11- Δ E as is was for the flagellum deficient mutant: When adopting, the culture was heterozygous and should therefore be made homozygous. Despite diverse efforts, the culture stayed heterozygous until now, not enabling meaningful analysis.

The gene expression pattern of *Nab. magadii* L11- Δ ORF79 and the wild type *Nab. magadii* L11 were compared by the use of Western Blots. Actually, several differences such as earlier appearance of capsid proteins and a shorter time span between this time point and the onset of lysis were observed in *Nab. magadii* L11- Δ ORF79.

The last topic is the identification of the promoter tnaN in *Nab. magadii*, which can be induced by adding tryptophane. Its activity as well as the one of the promoter tna from *Hfx. volcanii* was quantified in *Nab. magadii*. Subsequently performed analysis concerning the function of putative holin controlled by these promoters did not allow definite conclusions so far.

Anhang

5.5 Danksagung

Während des Studiums und speziell während des vergangenen Jahres haben viele Menschen zu meiner Arbeit, meinem Studium und meinem Leben beigetragen und mich unterstützt. Da ich nicht alle namentlich erwähnen kann, will ich gleich zu Beginn all diesen Personen sagen: Danke!

Von den namentlich erwähnten gilt mein Dank zunächst Prof. Dr. Angela Witte, die mir diese Diplomarbeit in dem mir bis dahin unbekannten Themenbereich der haloalkaliphilen *Archaea* ermöglicht hat. Mit großer Geduld, Offenheit und nicht zuletzt beeindruckendem Fachwissen hatte sie neben einem offenen Ohr auch Antworten für meine zahlreichen Fragen, die als Quereinsteigerin mitunter ungewöhnlich waren. Überdies gelang ihr der Spagat zwischen Betreuung und Anleitung zur Selbständigkeit, Kritik und Anerkennung.

Gleich am Arbeitsplatz bleibend will ich dem „Halolab“ danken, bestehend aus Katharina Dimmel, Judith Beraha und den jeweils aktuellen Bachelor-Studierenden. Ebenfalls zu nennen sind die kürzlich ausgeschiedenen Mag.^a Tatjana Svoboda, Petra Till und Daniel Kiesenhofer. Das Halolab war ein großartiger Arbeitsplatz, in dem effizientes, genaues, wissenschaftliches Arbeiten und eine sehr kollegiale Atmosphäre keine Widerspruch darstellten. Weiters möchte ich den Leiter/-innen der umliegenden Labore, Prof. Dr. Udo Bläsi und Mag. Dr. Isabella Moll stellvertretend für ihre Mitarbeiter/-innen meinen Dank aussprechen.

Meinen Eltern Brigitte und Herbert, ebenso meiner Schwester Judith danke ich für ihre umfassende Unterstützung und ihr Interesse an meinen Ausführungen. Dies gilt auch für meinen Verlobten Stefan, der mich den ganzen Weg durch mein Studium begleitet hat. Auch dir: Danke.

Anhang

Anhang

5.6 Curriculum Vitae

Zur Person

Name: Beatrix Alte
Geburtsdatum und -ort: 14. Dezember 1985, Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1992-1996 Volksschule in Teesdorf

1996-2004 Gymnasium Biondegasse in Baden; Abschluss mit Matura (Notenschnitt 1,57)

2004-2011 Diplomstudium der Chemie an der Universität Wien

Jul. 2005-Mai 2006 Ausbildung zur Rettungssanitäterin beim Österreichischen Roten Kreuz

Sept. 2009-Sept. 2010 Ausbildung zur Notfallsanitäterin beim Österreichischen Roten Kreuz

Sept. 2010-Sept. 2011 Diplomarbeit (Fach Biochemie) im Labor von Prof. Dr. Angela Witte; Department für Microbiologie, Immunobiologie und Genetik; Universität Wien, Österreich

Sonstiges:

2004 Preisträgerin der GEN-AU SummerSchool
Pyrotechnik Klasse 3

seit 2006 Freiwilliges Engagement beim Österreichischen Roten Kreuz (Rettungs- und Krankentransportdienst, Breitenausbildung, Jugendarbeit)

2011 Tutorin an der Universität Wien (Übung III A - Molekularbiologische Laborarbeiten)

Tutorin an der FH Campus Wien (Molekularbiologische Übungen II)